

UNIVERSITÉ CLERMONT II - BLAISE PASCAL
U.F.R. Sciences et Technologies

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(CHIMIE des MATÉRIAUX)

par

Jérémy SOULIÉ
Maître ès-Sciences, Master de Chimie

**Synthèse par voie sol-gel et réactivité *in vitro*
de verres bioactifs dopés, mésostructurés et macrostructurés.
Caractérisation par micro-faisceaux d'ions.**

Thèse soutenue publiquement le 27 septembre 2010, devant la commission d'examen :

Président	M.	C.	BONHOMME	
Examineurs :	M.	R.	BACKOV	Rapporteur
	M.	E.	JALLOT	Directeur de thèse
	M.	P.	LAQUERRIERE	
	M.	J.M.	NEDELEC	Co-directeur de thèse
	Mme	I.	REICHE	Rapporteur

En de pla laura, que cau atela soun aray à uo estelo.

Proverbe gascon.

Remerciements

La présente thèse n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Je voudrais, au travers de ces quelques lignes, les remercier pour l'enrichissement scientifique et humain, qu'elles m'ont apporté.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à Messieurs Baldit et Mahiou directeurs respectifs du Laboratoire de Physique Corpusculaire et du Laboratoire des Matériaux Inorganiques, pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires.

Je voudrais exprimer ma gratitude à Edouard et Jean-Marie, mes directeurs de thèse, pour les conseils qu'ils m'ont prodigués et la confiance qu'ils m'ont accordée. Leur grande culture scientifique, leur passion pour la recherche et leur bienveillance m'ont permis d'évoluer dans une atmosphère idéale. J'ai pu ainsi effectuer ma thèse dans un contexte de liberté et de sérénité et engranger expérience et savoirs, grâce à leurs compétences complémentaires.

Je remercie Madame Ina Reiche, Chargée de Recherche au Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France, et Monsieur Rénal Backov, Professeur à l'Université Bordeaux 1, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je leur sais gré de la pertinence de leurs remarques, ainsi que de la qualité de leurs commentaires. Par ailleurs, je suis reconnaissant envers Monsieur Patrice Laquerrière, Professeur à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg pour sa participation au jury de thèse et pour ses commentaires avisés sur l'ensemble de mon travail et envers Monsieur Christian Bonhomme, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Cette thèse, par essence pluridisciplinaire aurait été impossible sans l'expertise qu'ont fournie plusieurs personnes, en particulier Philippe Moretto et Stéphanie Sorieul, ainsi que tous les membres du CENBG intervenant sur l'accélérateur, qui n'ont pas été de trop pour 'dompter' les lignes micro et nanofaisceau, Mhammed Benbakkar pour les analyses par ICP-AES, Anne-Marie Gélinaud et Christelle Blavignac pour les clichés MEB et MET, Vanessa Prevot pour ses conseils sur la synthèse des matériaux macroporeux, Guillaume Renaudin pour les diffractogrammes de carbonates de calcium, Joël Cellier et André De Roy pour la DRX aux petits angles et Stéphanie Veysseire, pour le travail d'orfèvre qu'elle a réalisé en ultramicrotomie.

Que ce soit au LPC ou au LMI, les membres des équipes dans lesquelles j'ai travaillé, ont aussi joué un rôle déterminant, entremêlant manips, squash, thés à la menthe et cafés, entraide, échanges gastronomiques et culturels, discussions scientifiques et soutien indéfectible à l'ASM ou au Stade Toulousain... J'ai donc une pensée amicale et nostalgique pour mes collègues Jonathan, Olivier, Adeline, Sandrine, Medou, Łukasz, Azzam, Mirek, Riccardo et Simone.

Je n'oublie pas les rencontres qui, au cours de mes études, m'ont aiguillé à travers les méandres de la physique-chimie, puis de la recherche. A ce titre je voudrais remercier Christophe Lucbert, Alain Fritsch, Frédéric Castet, Vincent Rodriguez, Thierry Cardinal et Evelyne Fargin. Ce fut par ailleurs un plaisir de franchir les étapes importantes qui ont mené à

ce doctorat, accompagné des amis qui ont partagé mes tribulations estudiantines langonnaises puis bordelaises.

Durant ces trois ans, j'ai eu la chance de goûter aux joies de l'enseignement en marge de mon travail de recherche. Mes premiers pas dans ce métier ont été facilités par un environnement propice, auquel ne sont pas étrangères Catherine, Sidonie, Mariline, Yamina, Céline et Anne.

Par leur soutien inconditionnel, tant moral que financier, tout au long de ces années, ma famille ainsi que ma belle-famille ont elles aussi contribué à cet aboutissement. Merci en particulier à mes parents, à mes grands-parents et à mes sœurs qui, sans faillir, m'ont suivi pas à pas jusqu'au bout de ce parcours.

Enfin, je remercie Laure, sans qui l'obtention de ce doctorat n'aurait pas la même saveur. Malgré la distance, elle a participé à mes côtés à cette aventure clermontoise, m'apportant son réconfort teinté d'humour dans les moments de doute.

Table des matières

Introduction	15
Partie 1 : Objet de l'Etude.....	21
Chapitre 1 Les Biomatériaux	23
1.1 Origine et définition	23
1.2 Tissu osseux et remodelage	24
1.3 Les substituts osseux	28
Chapitre 2 Verres bioactifs	33
2.1 Verres bioactifs : invention et évolutions.....	33
2.2 Influence des facteurs biologiques sur le choix des verres étudiés.....	37
Partie 2 : Elaboration des matériaux d'intérêt.....	43
Chapitre 3 Homogénéité chimique du dopage via la méthode sol-gel	45
3.1 La voie sol-gel.....	45
3.2 Synthèse de verres $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, dopés en Oxydes de Zinc ou de Magnésium	53
3.3 Propriétés texturales	59
Chapitre 4 Auto-organisation de molécules et verres mésostructurés	69
4.1 Principe : mésoporosité induite par des tensioactifs structurants.....	69

4.2 Elaboration de verres bioactifs mésostructurés	73
Chapitre 5 Verres macroporeux : du cristal de billes à l'opale inverse	81
5.1 Macroporosité organisée.....	81
5.2 Synthèse de verres bioactifs macroporeux	83
Partie 3 : Caractérisation des interactions physico-chimiques verre bioactif / milieu biologique.....	95
Chapitre 6 Etude typique : Méthodologie	97
6.1 Echantillonnage.....	97
6.2 Exploitation des données micro-PIXE et RBS	100
Chapitre 7 Verres binaires et ternaires dopés en magnésium.....	105
7.1 Cartographies chimiques.....	105
7.2 Evolution des concentrations élémentaires au sein des matériaux.....	109
7.3 Evolution de la composition du milieu biologique.....	114
7.4 Discussion.....	116
Chapitre 8 Verres ternaires dopés en zinc.....	125
8.1 Cartographies chimiques.....	125
8.2 Evolution des concentrations chimiques au sein des grains de verres.....	127
8.3 Evolution de la composition du milieu biologique.....	129
8.4 Discussion.....	131

Chapitre 9 Comparaisons des cinétiques d'évolution structurale des verres dopés	135
Chapitre 10 Verres binaires et ternaires mésostructurés	139
10.1 Cartographies chimiques.....	139
10.2 Evolution des concentrations chimiques au sein des grains de verres.....	142
10.3 Evolution de la composition du milieu biologique.....	145
10.4 Discussion.....	147
Chapitre 11 Verres binaires et ternaires macrostructurés.....	155
11.1 Cartographies chimiques.....	155
11.2 Evolution des concentrations chimiques au sein des grains de verres.....	156
11.3 Evolution de la composition du milieu biologique.....	159
11.4 Discussion.....	161
Conclusions et perspectives	167
Annexe : Micro-analyses par faisceaux d'ions.....	173
Chapitre 1 Micro-analyse par faisceaux d'ions : Techniques PIXE et RBS	175
1.1 Interactions ions-matière	175
1.2 Emission X induite par des particules chargées	178
1.3 Spectrométrie de rétrodiffusion Rutherford: RBS	194
1.4 Dispositif expérimental	199

Bibliographie	207
----------------------------	------------

Introduction

Bien que l'utilisation de biomatériaux artificiels remonte à plusieurs siècles, leur développement a connu un essor majeur durant ces quarante dernières années. La finalité de l'implantation d'un biomatériau est le remplacement d'un organe lésé en remédiant à ses déficiences fonctionnelles. L'émergence des grandes familles de biomatériaux, que sont les polymères, les céramiques ou les métaux, a été conditionnée par la diversité et la complexité des organes et tissus du corps humain. Parmi cette multitude, focalisons-nous plus particulièrement sur les matériaux susceptibles de remplacer le tissu osseux.

Pendant de nombreuses années, le choix des substituts osseux synthétiques a été dicté uniquement par la fonction mécanique de l'os, associée à la non-toxicité du matériau. Une meilleure compréhension de la biologie du tissu osseux, notamment de sa régénération, alliée à une maîtrise de plus en plus fine des propriétés des matériaux ont depuis permis l'émergence de nouveaux concepts.

Le développement de verres bioactifs s'insère dans cette approche pluridisciplinaire, point de convergence de la biologie, de la chirurgie, de la chimie et de la physique. Cette famille de substituts est particulièrement adaptée au comblement de défauts osseux et aux revêtements prothétiques en chirurgie orthopédique, maxillo-faciale et dentaire. En effet, au contact de tissus vivants, les verres bioactifs engendrent une série de réactions physico-chimiques à l'interface matériau/tissus osseux qui conduisent à la formation d'une couche de phosphate de calcium. L'évolution de cette couche lui confère *in fine* une structure similaire à celle de la phase minérale de l'os. D'un point de vue strictement biologique, la présence de cette couche est extrêmement bénéfique, car elle est un site de minéralisation privilégié pour les cellules osseuses, ce qui permet à terme un lien intime entre le verre bioactif et les tissus hôtes. C'est cette liaison qui caractérise la *bioactivité* d'un matériau. Cette dernière est conditionnée par l'interdépendance complexe de plusieurs paramètres du verre.

La double problématique de ce travail de thèse est étroitement liée à la notion de bioactivité.

Premièrement, comment les outils de chimie et de physico-chimie permettent de contrôler finement les propriétés du verre initial telles que la composition ou la texture, et ainsi moduler la bioactivité ? En ce sens, des verres d'oxydes de silicium, calcium et phosphore ont été élaborés. Les propriétés qui leur ont été conférées ont été d'une part le dopage en zinc ou en magnésium, et d'autre part une porosité contrôlée, à savoir mésostructuration ou macrostructuration.

Deuxièmement, comment évaluer de manière quantitative et résolue spatialement l'impact de ces paramètres sur l'amplitude et la cinétique de la physico-chimie (dissolution du verre, formation de précipités phosphocalciques...) de la bioactivité *in vitro* ? Les techniques d'analyse par micro-faisceaux d'ions sont adaptées à cette étude et notamment l'émission X induite par particules chargées (PIXE) couplée à la spectrométrie de rétrodiffusion de Rutherford (RBS). En effet, la microsonde nucléaire PIXE-RBS possède une sensibilité de l'ordre du ppm qui l'indique tout particulièrement pour l'étude des éléments traces comme le magnésium ou le zinc. En outre, la possibilité de réaliser des cartographies chimiques avec une résolution micrométrique permettant une discrimination spatiale de l'analyse en fait un atout majeur dans l'étude de nos matériaux.

Ce manuscrit est divisé en trois parties :

La **première partie** s'attache à décrire brièvement le tissu osseux, les pathologies qui l'affectent et les conditions imposées à un matériau pour qu'il soit un substitut osseux potentiel. Une attention particulière sera portée aux verres bioactifs.

La **deuxième partie** traite de l'élaboration des verres d'intérêt. Ainsi il sera question du dopage des verres grâce au procédé sol-gel, du rôle des tensioactifs dans la mésostructuration et des méthodes induisant une macrostructuration, mais aussi des méthodes permettant la caractérisation de ces matériaux.

La **troisième partie** présente les résultats de l'étude, *via* des cartographies élémentaires obtenues par PIXE et des cinétiques d'évolution des concentrations chimiques dans les verres. Une discussion sur chacun de ces résultats sera également développée, s'appuyant sur des arguments susceptibles d'éclaircir les effets de chaque paramètre étudié sur la physico-chimie de la bioactivité.

Enfin, la **conclusion** de cette étude et les perspectives qui s'en dégagent seront présentées.

Partie 1 : Objet de l'Etude

Chapitre 1 Les Biomatériaux

1.1 Origine et définition

Le remplacement de tissus humains, affectés par une pathologie ou par une blessure ne date pas de l'époque contemporaine. Parmi les premiers cas recensés, on peut citer l'exemple de disques de métaux précieux (argent et or) utilisés pour remplacer l'os suite à une trépanation¹. Ces 'cranioplasties', qui datent d'environ 4000 ans ont été réalisées dans les civilisations pré-Incas au Pérou, sur des patients ayant survécu suffisamment longtemps pour que la cicatrisation du tissu osseux, s'adapte à la forme du 'corps étranger'. On trouve la trace de quelques autres exemples probants comme l'utilisation de sutures en fil de coton, poil de cheval ou fibre de chanvre, par le chirurgien indien Shusruta vers le V^{ème} siècle avant J.C.², ou des prothèses dentaires composées de coquilles de mollusques bivalves datant du VII^{ème} siècle, et retrouvées au Honduras³. Cependant, les tentatives antérieures au XX^{ème} siècle demeurèrent globalement infructueuses, principalement du fait de la non-compréhension du phénomène de biocompatibilité⁴.

Un changement majeur survint à l'issue de la Seconde Guerre Mondiale, lorsque les matériaux initialement prévus à des fins militaires, devinrent utilisables pour des applications plus générales. Des matériaux commerciaux (métaux, céramiques, polymères) furent alors adaptés par les chirurgiens à des applications cliniques⁵. Suite à ces développements, un tout nouveau domaine de recherche a été initié dans les années 1960, ayant pour but la conception de biomatériaux aux propriétés biologiques accrues. Durant la seconde conférence de consensus sur la définition des biomatériaux⁶, ces derniers ont été définis ainsi :

'Matériaux destinées à interagir avec des systèmes biologiques pour évaluer, traiter, augmenter, ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps'

Le domaine des biomatériaux est donc par essence pluridisciplinaire, puisqu'il implique la fabrication du matériau possédant les propriétés désirées (mécanique, chimie...), ainsi que l'étude de l'impact du matériau sur le 'milieu vivant' et réciproquement (Biologie, Physico-chimie). Différentes pathologies, touchant des fonctions et organes divers peuvent être

potentiellement traitées grâce aux biomatériaux. On peut citer, sans être exhaustif, des applications en ophtalmologie (cristallin artificiel), chirurgie vasculaire (cœur artificiel, stimulateur cardiaque), odontologie (comblement dentaire, orthodontie) et enfin en chirurgie orthopédique et plus spécifiquement, les problématiques liées à l'os et aux substituts osseux.

1.2 Tissu osseux et remodelage

1.2.1 Le tissu osseux

Le corps humain comporte 206 os, chacun parfaitement adapté à son rôle, de par sa forme, ou sa distribution spatiale. D'un point de vue anatomique, on distingue les os longs (membres), courts (poignets, cheville), plats (sternum, crane) et intermédiaires (bassin, vertèbres...). Au-delà des spécificités de chacun, la fonction de l'os est triple : **i)** Fonction de soutien mécanique, puisque les os forment la charpente de l'appareil locomoteur, **ii)** Fonction de protection des organes vitaux et de la moelle osseuse, **iii)** Fonction de régulation métabolique, car la délivrance ou le stockage de calcium par l'os permet de réguler sa concentration dans le sang et ainsi l'approvisionnement des cellules.⁷

Le tissu osseux est organisé hiérarchiquement sur plusieurs échelles de taille (Figure 1-1) : la structure globale est donc décomposée en quatre niveaux : (A) macrostructure, (B) microstructure, (C) 'sub-microstructure' et nanostructure (D).

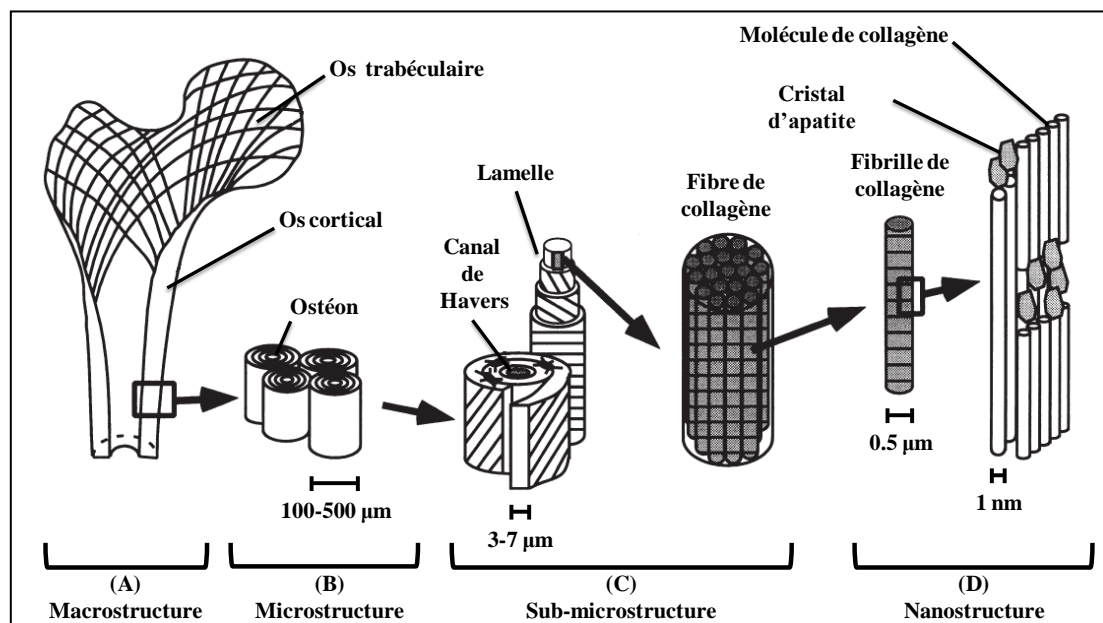


Figure 1-1 : Organisation structurale hiérarchique de l'os⁸.

A un niveau macroscopique (A), deux types d'os peuvent être distingués (Figure 1-2) : l'os cortical ou compact qui se situe généralement en périphérie de l'os (par exemple dans le fémur), et dont la porosité est relativement faible (20% volumique), et l'os trabéculaire ou spongieux qui se situe à l'intérieur de l'os (et aux extrémités pour les os longs) et qui contient la moelle osseuse car sa porosité est supérieure à 70%).

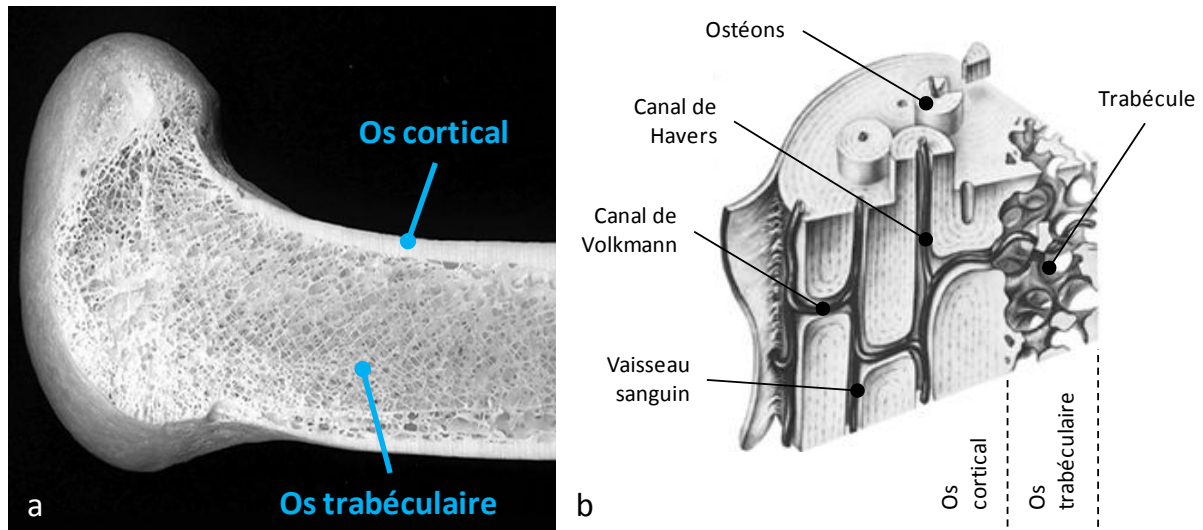


Figure 1-2 : a) Coupe longitudinale d'un fémur humain dont on a retiré la moelle rouge⁹ ; b) Détail de la microstructure de l'os¹⁰.

La microstructure (B) diffère suivant le type d'os. Dans le cas de l'os trabéculaire, il s'agit de 'trabécules', qui sont les minces filaments formant un réseau interconnecté. En ce qui concerne l'os cortical, on peut observer les Systèmes Haversiens ou Ostéons. Les ostéons ressemblent à des cylindres d'un diamètre compris généralement entre 200 et 250 μm . Ces cylindres sont parallèles entre eux et à l'axe long de l'os. Au centre des ostéons se trouve le canal de Havers qui permet entre autre de vasculariser ces structures via un capillaire. Les lamelles (3 à 7) formant la sub-microstructure (C), s'organisent concentriquement autour du canal central. Ce sont des couches distinctes et parcourues par de fines fibres parallèles les unes aux autres au sein d'une même couche. Ces fibres sont elles-mêmes des composites organiques-inorganiques (D). La composante organique est constituée de fibrilles de collagènes (environ 300 nm de longueur et 1,5 nm de diamètre) organisées en phases de cristal liquide de type cholestérique¹¹. Enfin, les molécules de collagène sont des glycoprotéines formées par l'enroulement de chaînes d'acides aminés en triple hélice¹². La composante minérale correspond quant à elle, à des nanocristaux ($\sim 4\text{nm}$) discoïdaux

d'*hydroxyapatite*¹³ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Pour être plus exact, l'apatite 'osseuse' n'est pas stœchiométrique, et comporte des espèces bivalentes hydrogénophosphates HPO_4^{2-} et carbonates CO_3^{2-} en substitution des groupements PO_4^{3-} . Une formule correcte pour décrire cette apatite est donc :



Cette structure permet en outre des réactions d'échange ionique comme la substitution du calcium par des ions tels que Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ou Sr^{2+} , ou la substitution des groupes hydroxydes OH^- par des ions fluorures ou chlorures (F^- et Cl^-).¹⁴

1.2.2 Le remaniement osseux

Bien qu'exacte, la description de la structure de l'os (*matrice extracellulaire*), au paragraphe précédent est incomplète. En effet, le tissu osseux n'est pas figé, et il évolue au cours du temps. Pour rendre compte de cette évolution, il est nécessaire de considérer les cellules osseuses. L'action continuelle et concertée des différentes cellules, permet un remaniement constant de l'os et de fait, ses propriétés, notamment mécaniques (flexibilité, rigidité) sont maintenues tout au long de la vie.

Les cellules osseuses se divisent en deux catégories suivant leur fonction. Les *cellules ostéoblastiques*, qui comprennent ostéoblastes matures, ostéocytes et cellules bordantes, sont spécialisées dans la synthèse de la matrice organique (collagène) et contribuent au processus de minéralisation. Les *cellules ostéoclastiques* sont quant à elles chargées de résorber le tissu osseux calcifié.

Le processus de renouvellement de l'os peut être décomposé en cinq étapes chronologiques¹⁵, (représentées Figure 1-3), et s'effectue au niveau d'unités fonctionnelles, les '*basic multicellular units*'¹⁶. Le remodelage est régulé de manière indépendante au niveau de chaque unité, et l'activité globale au niveau tissulaire est fonction du nombre de foyers de remodelage en activité.

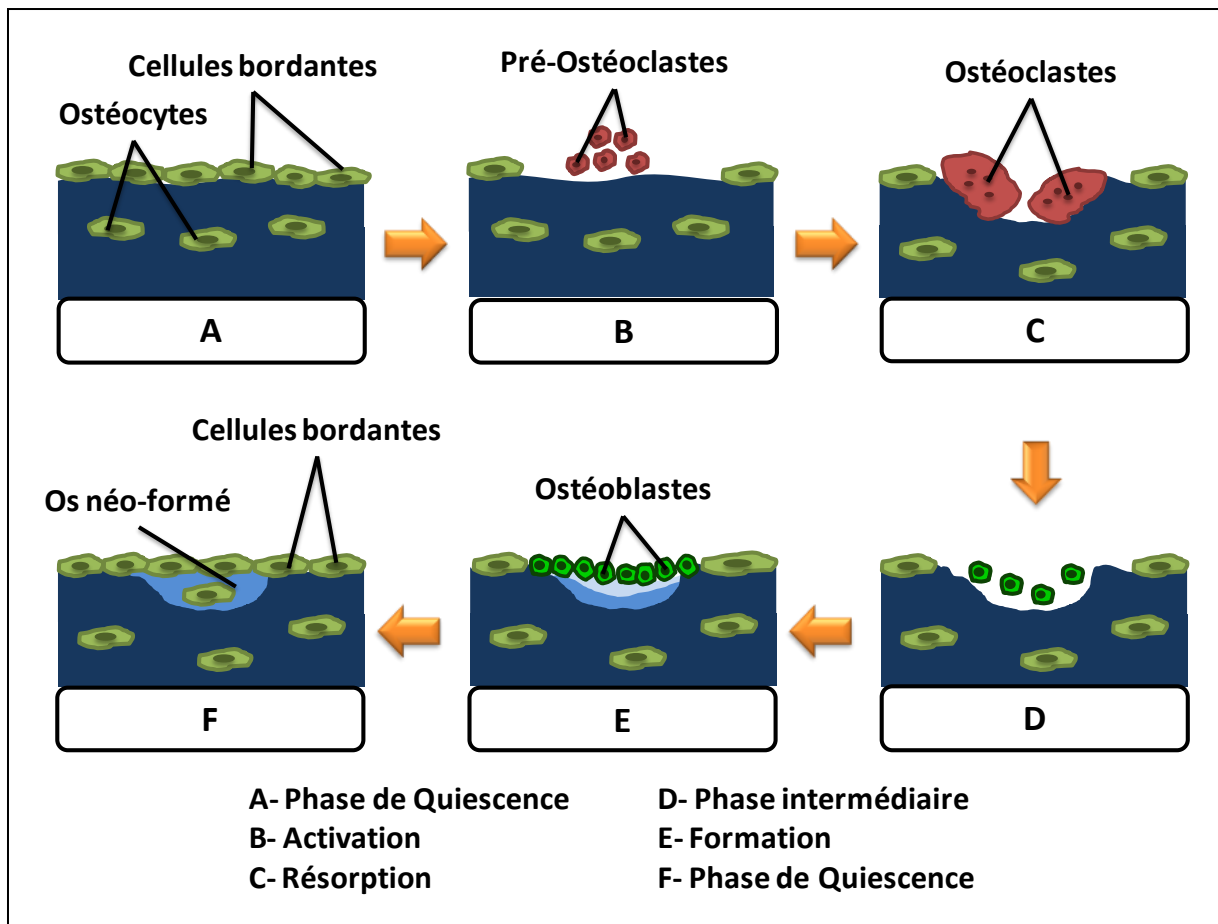


Figure 1-3 : Processus du remodelage osseux.

Un cycle de remaniement osseux débute par un phénomène d'activation (Figure 1-3/B) d'une surface initialement inactive (A). Cette activation est initiée par la prolifération, puis la fusion de pré-ostéoclastes en ostéoclastes. Ces derniers, qui sont des cellules géantes multinucléées, reconnaissent la zone déterminée de la surface osseuse sur laquelle ils doivent agir, et adhèrent à celle-ci. Les ostéoclastes résorbent alors le tissu osseux (C), via une diminution locale de pH qui dissout la composante minérale, alors que la matrice organique est dégradée par certaines enzymes¹⁷. Dès lors que la lacune de résorption est créée (environ 50 μm de profondeur moyenne sur 1 mm de long), les ostéoclastes se détachent de la paroi osseuse. Suit alors la phase intermédiaire (D), durant laquelle différents signaux permettent l'attraction puis la prolifération des ostéoblastes. L'étape de formation (E) est caractérisée par l'apposition par les ostéoblastes d'une matrice collagénique, qui se minéralise. Cette minéralisation est conditionnée par essentiellement deux paramètres : une concentration locale adéquate en minéraux, ainsi que l'existence de sites de nucléation, ces derniers étant situés entre les fibrilles de collagène. Lors de la formation du nouveau tissu osseux, la

majorité des ostéoblastes se laissent emmurer dans la matrice qu'ils ont synthétisée. D'autres ostéoblastes, 's'aplatissent' et forment une couche de cellules bordantes alignées le long de l'os néoformé. Un réseau de canalicules (non représenté sur la figure) s'étend entre les cellules bordantes et les ostéocytes, grâce auquel, nutriments, minéraux et autres molécules peuvent circuler entre la surface et l'os profond. L'os présente alors les caractéristiques d'une nouvelle phase de quiescence (**F** et **A**).

N.B. : Durant le cycle de remodelage, la synchronisation de l'action de ces différentes cellules, ainsi que leur prolifération ou leur adhésion sont dirigées par des mécanismes biologiques complexes (notamment via des signaux hormonaux) qui ne sont pas décrits ici.

1.3 Les substituts osseux

1.3.1 Pathologies

La pathologie la plus fréquemment citée est l'ostéoporose. Suivant la définition de l'organisation mondiale de la santé¹⁸, il s'agit d'une *'maladie généralisée du squelette, caractérisée par une densité osseuse basse et des altérations de la microstructure osseuse, responsable d'une fragilité osseuse exagérée et donc d'un risque élevé de fracture.'* L'ostéoporose est due à un dysfonctionnement des mécanismes biologiques précédemment décrits, et conduit à une balance résorption/formation négative. Le taux de remodelage osseux est donc très faible, ce qui induit irrémédiablement une perte de masse osseuse traduite par une augmentation de la porosité des os (Figure1-4) et une diminution des épaisseurs corticales. Les zones de fragilités présentant des risques de fracture accrus, sont chez les personnes atteintes, le col du fémur et les vertèbres.

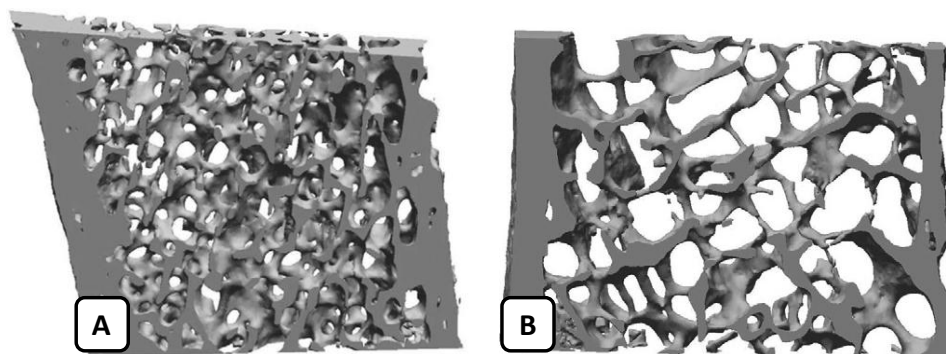


Figure 1-4 : Images obtenues par microtomographie X de l'os iliaque. A-Chez un sujet jeune. B-Chez un sujet ostéoporotique.¹⁹

D'autres pathologies, beaucoup moins fréquentes, peuvent affecter la rigidité ou la flexibilité des os, qu'elles soient dues à une 'balance négative' comme l'ostéoporose, ou à des défauts intervenant dans la synthèse du collagène²⁰. Le cancer de l'os est lui aussi générateur de perte de tissu osseux sain, de par la multiplication des métastases ou, après un traitement chirurgical²¹. Enfin, il convient d'ajouter les fractures concernant des individus sans pathologies particulières, et liées à des accidents.

1.3.2 Substituts osseux

Le traitement des complications squelettiques (fractures jointives, non-jointives, perte osseuse), liées aux pathologies décrites précédemment, requiert l'emploi de substituts afin de réparer, consolider, combler les défauts engendrés, restaurant ainsi la fonction de l'os. Avant d'envisager une stratégie quant au choix des matériaux, et au-delà du rôle mécanique de l'os, il est utile de considérer plusieurs propriétés nécessaires à un substitut osseux idéal²².

- La *biocompatibilité* d'un substitut est une condition *sine qua non*. Actuellement, il est admis que la biocompatibilité '*se réfère à la capacité d'un matériau à fonctionner avec une réponse du tissu hôte approprié dans une situation spécifique*'²³. Cette définition très large traduit un impératif d'interaction positive ou du moins neutre entre l'implant et le tissu hôte. Elle peut être explicitée par l'antagonisme biocompatibilité / biotoxicité. En effet, un biomatériau (ou ses produits de décomposition) ne doit pas affecter l'intégrité des tissus ou le fonctionnement de l'organe. Par ailleurs, les réactions inflammatoires déclenchées par la toxicité fragilisent l'interface de l'implant, et empêchent son intégration. De nombreux facteurs peuvent influencer sur cette propriété (Tableau 1-1).

- L'*ostéoconduction* est la capacité d'un matériau à servir 'd'échafaudage' pour guider la formation de l'os et permettre une interface intime et solide. Elle est en partie liée à la rugosité, à la surface spécifique (importance de l'interface) et à la porosité (taille et forme). Un substitut ostéoconductif permet notamment l'invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur.

- L'*ostéoinduction* d'un biomatériau implanté, permet de générer la formation osseuse en site extra-osseux, grâce à sa capacité d'induire une différenciation cellulaire et ainsi synthétiser une matrice osseuse minéralisable.

Composition, micro/nanostructure, morphologie

Cristallinité, cristallographie

Constantes mécaniques

Quantité d'eau, balance hydrophile/hydrophobe

Composition chimique de la surface, gradients chimiques, mobilité moléculaire de surface

Topographie, énergie et propriétés électronique de surface

Paramètres de corrosion, profil de relargage ionique, toxicité des ions relargués (métaux, alliages et céramiques)

Profil de dégradation, produits de dégradation (polymères)

Débris dus à l'érosion

Tableau 1-1: Exemples de paramètres influençant la réponse du tissu hôte²⁴.

Le choix d'un substitut osseux dépend de la localisation, du volume de la perte osseuse, du contexte local et général, de la pathologie et des propriétés particulières du substitut. Il existe donc plusieurs catégories de substituts osseux. Une première distinction se fait entre les substituts d'origine naturelle et ceux d'origine synthétique.

- Les **matériaux d'origine naturelle**, sont constitués essentiellement de pièces de tissus osseux, appelés greffons. Les greffes sont de plusieurs types. Il s'agit d'une *autogreffe* lorsque le greffon provient du receveur lui-même. La crête iliaque est très souvent choisie comme site donneur du en partie à son accessibilité. L'autogreffe est l'implant aux potentiels ostéoconducteur et ostéoinducteur les plus élevés, notamment grâce à l'absence de réponse immunitaire.²⁵ Les inconvénients proviennent surtout d'une quantité d'os limitée et des complications liées au site donneur (douleur, infection de la plaie, fractures)²⁶. Lorsque le greffon provient d'un autre organisme, les transplantations sont désignées sous les termes d'*allogreffes* (donneur humain), ou xénogreffes (espèce animale). Dans ce cas, le risque réside d'une part dans le rejet de l'implant après une réaction immunitaire, et d'autre part dans la transmission potentielle d'agents infectieux (VIH, hépatite pour un donneur humain) ou de bactéries. Ostéoconduction et ostéoinduction sont cependant optimales pour les allogreffes²⁷.

- Il existe plusieurs catégories de **substituts osseux de synthèse**, parmi lesquelles les métaux, les polymères et les 'céramiques'. Des composites de ces matériaux sont par ailleurs utilisés. Au sein de l'équipe, nous sommes intéressés plus particulièrement par les céramiques bioactives. Les céramiques sont généralement définies comme des composés inorganiques

non-métalliques. Dans le domaine des biomatériaux, elles peuvent être cristallines ou vitreuses. Elles sont et ont été très étudiées et font l'objet de plusieurs revues²⁸. Hench a établi une classification des biocéramiques suivant leur comportement vis-à-vis du tissu hôte, notamment leur interface et leur fixation²⁹.

Les *biocéramiques inertes non poreuses* constituent le premier type de biocéramiques. La plus employée est l'alumine Al_2O_3 , qui présente une excellente résistance à la corrosion, une bonne compatibilité et des propriétés mécaniques élevées. Les mauvaises propriétés de fixation, sont le point faible de ce matériau : en effet, l'implant est seulement maintenu par les irrégularités de surface, emprisonnées dans l'os après sa croissance (fixation morphologique).

Les *biocéramiques inertes poreuses* sont souvent constitué des mêmes matériaux que les précédentes. Et malgré des propriétés mécanique moins importantes, elles permettent une bien meilleure fixation, du fait de l'interpénétration du substitut et du tissu osseux (fixation biologique).

Les *matériaux biodégradables* sont conçus pour se dégrader progressivement sur une période de temps donnée, afin d'être à terme, remplacés totalement par le tissu hôte. Dans ce cas particulier l'interface est très fine voire inexistante. Deux problèmes principaux se posent : le maintien d'une interface stable et résistante durant le processus de transformation, et des vitesses de résorption adaptées au taux de réparation des tissus. Le phosphate tricalcique β ou β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) est un des représentants majoritaires de cette catégorie.

Enfin, les *matériaux bioactifs*, qui possèdent une surface très réactive, permettent une liaison forte et intime entre os et implant. Ils sont constitués par l'hydroxyapatite et ses dérivés non-stœchiométriques, les vitrocéramiques et les verres bioactifs. Ces derniers (ainsi que leurs propriétés) constituent l'objet de cette étude et sont plus précisément décrits au chapitre 2.

Chapitre 2 Verres bioactifs

2.1 Verres bioactifs : invention et évolutions

2.1.1 Premier Bioverre®, bioactivité et mécanismes

2.1.1.1 Découverte

Les verres bioactifs ont été découverts par Hench en 1969 (Bioglass®), ce qui a donné lieu à la première publication sur le sujet³⁰ en 1971. Plusieurs verres d'oxydes $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ obtenus par fusion, ont été étudiés (Figure 2-1). Les tests *in vivo* ont montré qu'en milieu biologique, une couche d'hydroxyapatite carbonatée se formait à la surface du verre. Ces cristaux se liant aux fibrilles de collagène produites par les ostéoblastes, permettent un lien chimique intime. L'interface avec l'implant est donc solide et sa résistance mécanique est supérieure ou égale à celle de l'os 'hôte'³¹. Le concept de bioactivité a donc émergé concomitamment à l'apparition des bioverres³² : *'Un matériau bioactif provoque une réponse biologique spécifique à son interface. Il en résulte la formation d'un lien entre les tissus et le matériau'*. Son comportement est intermédiaire, se situant entre ceux des matériaux résorbables et bioinertes.

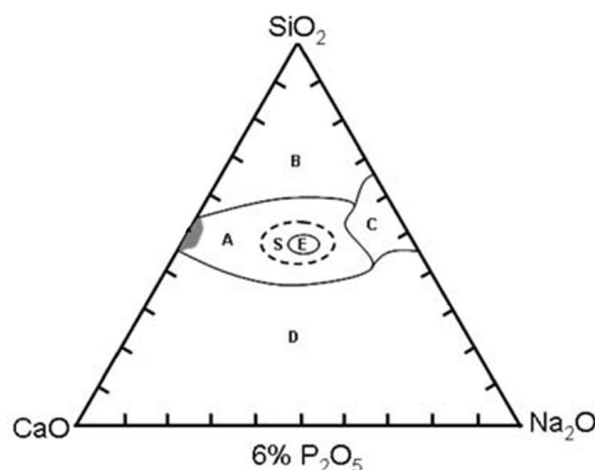


Figure 2-1 : Effet de la composition (pourcentage massique) de verres bioactifs sur leur interface avec le tissu hôte³³

2.1.1.2 Classification de la bioactivité et mécanismes

En considérant la projection du diagramme quaternaire, représenté en Figure 2-1, il a été mis en évidence, que les mécanismes de fixation, la résistance et l'épaisseur de l'interface ainsi que l'évolution dans le temps différaient suivant la composition. De ces observations découlent des tentatives pour quantifier puis classer la bioactivité. Le niveau de bioactivité d'un matériau peut être relié au temps nécessaire pour que plus de 50% de son interface soit liée aux tissus. Un indice de bioactivité a été introduit par Hench en 1988 tel que :

$$I_B = 100/t_{0,5bb}$$

où $t_{0,5bb}$ est le temps nécessaire exprimé en jours pour que plus de 50% de l'interface soit liée aux tissus.

Les différentes valeurs que peut prendre cet indice pour des compositions relativement proches ont laissé entrevoir la prépondérance de facteurs biochimiques intervenant à l'interface. Une hypothèse permettant de prendre en compte ces écarts a permis, en 1994, de classer les matériaux bioactifs en deux catégories³⁴ :

- Les matériaux de **classe A** favorisent l'ostéoconduction et l'ostéoinduction. Ils se fixent plus rapidement à l'os. En effet leur cinétique de réactivité accélérée permet le relargage d'espèces chimiques, qui stimulent la différenciation et la prolifération des cellules osseuses et favorisent ainsi un lien rapide, solide et intime avec l'os³⁵. Ils peuvent en outre se lier à des tissus non-osseux comme les cartilages, grâce à leurs propriétés ostéoconductrices
- Les matériaux de **classe B** sont seulement ostéoconducteurs. Une dissolution de surface lente induit de fait une concentration ionique trop basse, ne permettant pas aux ostéoblastes une recombinaison aisée des précurseurs inorganiques.

L'illustration de cette classification se traduit sur la Figure 2-1. Dans les zones B et C, il n'y a pas de lien entre verre et tissu, du fait d'une réactivité trop lente les matériaux de la zone B (matériaux quasi-inertes provoquant la formation de capsules fibreuse à l'interface), trop rapide pour ceux de la zone C (résorption en une dizaine de jours). Les compositions du domaine D ne conduisent pas à l'obtention d'un verre monophasé. Dans la zone A, les verres sont bioactifs et ils sont de *classe A* dans la zone S ($I_B > 8$). Enfin, la zone E représente la composition du premier verre bioactif breveté Bioglass®³⁶. Par la suite nous nous

intéresserons plus particulièrement à des verres de classe A. Il est donc utile de décrire l'évolution chronologique des mécanismes biologiques et physico-chimiques se déroulant à l'interface de ce type de verre après son implantation. Chacune de ces étapes a été décrite de manière exhaustive par plusieurs auteurs, et elles ont été résumées par Hench³⁷.

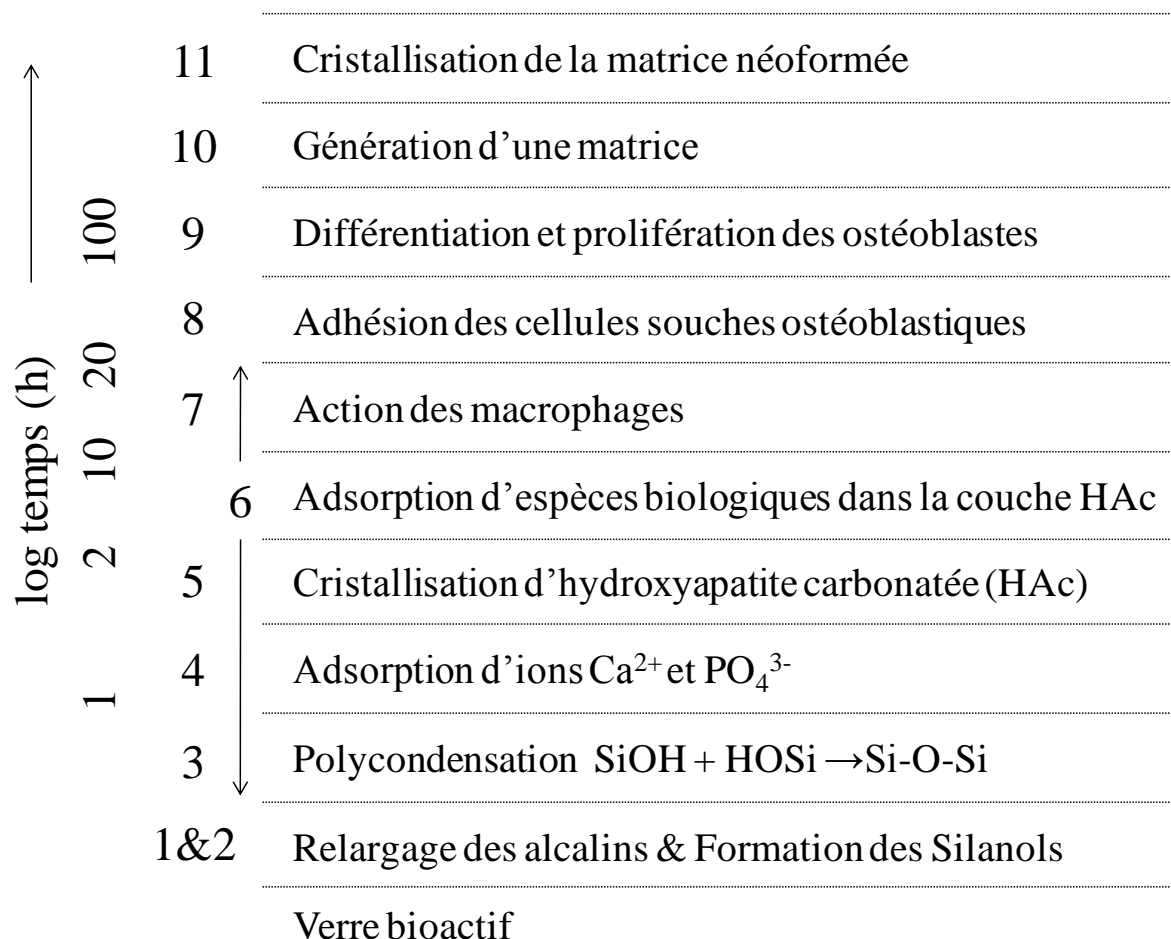


Figure 2-2 : Séquence des réactions interfaciales permettant la formation d'une liaison entre les tissus osseux et le verre bioactif.³⁷

Le mécanisme décrit fait intervenir dans un premier temps des réactions purement physico-chimiques (1 à 5) qui ne dépendent pas de la présence de tissus. L'**étape 1** permet un échange ionique rapide des alcalins ou alcalino-terreux (Na^+ , Ca^{2+}) avec les ions H^+ du milieu. Lors de l'**étape 2**, la rupture des liaisons Si-O-Si induit la formation de groupements silanols Si-OH à la surface du verre. L'**étape 3** correspond à des réactions de condensation. Cette repolymérisation crée une couche poreuse riche en silice et appauvrie en alcalins et alcalino-terreux. La présence de cette couche initie l'**étape 4**, durant laquelle les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-}

migrent à travers celle-ci et s'accumulent pour former une couche phosphocalcique amorphe. Cette dernière croît progressivement avec l'accumulation de ces espèces ioniques. Enfin, l'**étape 5** concorde avec la cristallisation de cette couche phosphocalcique grâce à l'incorporation d'anions OH^- et CO_3^{2-} , conduisant notamment la formation d'hydroxyapatites carbonatées. Cette première partie du mécanisme étant utile à la compréhension des phénomènes mis en évidence au chapitre 8, elle sera alors décrite plus en détails.

Les réactions 7 à 11 traitent des réactions biologiques qui caractérisent l'interaction entre le verre et un tissu vivant. Durant l'**étape 6**, l'adsorption d'espèces biologiques et particulièrement de protéines est facilitée par la porosité nanométriques et les charges négatives dues aux silanols. Le rôle principal des macrophages est le nettoyage de corps nécrotiques ou apoptotiques. (**Etape 7**). Enfin les **étapes 8 à 11** s'inscrivent dans un cycle de construction osseuse similaire à celui décrit au chapitre précédent.

2.1.2 Avantages de la voie sol-gel & évaluation simplifiée de la bioactivité

Deux étapes importantes ont fait évoluer l'étude des verres bioactifs. La première concerne leur élaboration.

2.1.2.1 Synthèse sol-gel

Dès la première utilisation de la technologie sol-gel dans la conception de verres bioactifs³⁸, cette voie de synthèse a ouvert de nombreuses perspectives dans le domaine. En effet, contrairement à la fusion, les températures utilisées sont basses. Il est par ailleurs possible de s'affranchir des modificateurs de réseau (sodium, potassium...) et ainsi atteindre de nouvelles compositions.³⁹ Outre la large gamme de propriétés texturales naturellement associées aux mécanismes sol-gel, ou induites par des stratégies plus complexes, cette technique permet la maîtrise et la mise en œuvre d'une pléthore de mises en forme et de morphologies : particules⁴⁰, mousses⁴¹, couches⁴², ou composites hybrides bioactifs⁴³. Une multiplication des paramètres susceptibles d'influer sur la bioactivité est donc possible via le procédé sol-gel, contrairement aux verres élaborés par fusion dont la seule variable est la composition. Les mécanismes de synthèse des verres sol-gel seront exposés plus en détail dans la partie 2.

2.1.2.2 Milieu Biologique

Le deuxième progrès significatif concerne l'emploi de liquides 'biologiques' pour tester la bioactivité. La question initiale est la suivante : comment évaluer la capacité d'un matériau à se lier avec le tissu osseux, en s'affranchissant dans un premier temps des tests *in vivo*, que ce soit pour des raisons d'éthique, ou d'efficacité. Kokubo, qui est un des précurseurs dans le domaine, a proposé en 1991, que le critère soit la formation d'apatite à la surface de matériaux artificiels, lorsque ces derniers sont immergés dans un milieu biologique simulé, le SBF (Simulated Body Fluid).⁴⁴ Cette interaction permet alors de 'prédire' le comportement du matériau une fois implanté, et plus spécialement les cinq premières étapes physico-chimiques décrites précédemment. Le SBF est une solution aqueuse dont la composition en ions minéraux est proche de celle du plasma sanguin. Bien qu'elle soit discutée et qu'elle montre ses limites⁴⁵, cette hypothèse de travail est globalement acceptée par la communauté, et sa validité a été prouvée sur plusieurs matériaux grâce aux similitudes de structure et de composition des phases formées *in vivo* et *in vitro*⁴⁶, et à la corrélation directe des évolutions cinétiques entre les épaisseurs d'os néoformé *in vivo* et de la couche d'apatite *in vitro*⁴⁷. Plus de précisions seront fournies sur les milieux physiologiques utilisés au cours de notre étude, dans le Chapitre 7.

2.2 Influence des facteurs biologiques sur le choix des verres étudiés

Pour cette étude, notre intérêt s'est porté sur des verres dopés, des verres mésoporeux et des verres macroporeux. Ces choix ont été dictés par des considérations sur le potentiel biologique de tels verres. Les paragraphes qui suivent décrivent donc dans quelle mesure ces paramètres peuvent influencer les 'réactions biologiques' lors de l'implantation.

2.2.1 Dopage

Plusieurs éléments chimiques ont un intérêt potentiel pour le dopage des verres, notamment le strontium⁴⁸ et l'argent⁴⁹ qui ont déjà fait l'objet de plusieurs études. Notre choix s'est porté sur le magnésium et le zinc. Ces éléments sont naturellement présents dans le corps et plus spécialement dans les os. Les pourcentages varient sensiblement d'un individu à

l'autre et suivant le type d'os. A titre d'exemple, on peut citer un article de Takata et *al.*, dont est tiré le Tableau 2-1.

Concentration (ppm)	Os Cortical	Os trabéculaire
Magnésium	1951 - 3147	620 - 1925
Zinc	85 - 140	30 - 121

Tableau 2-1 : Domaines de concentrations élémentaires (ppm), d'os costaux corticaux et trabéculaires.⁵⁰

En outre plusieurs études ont mis en évidence l'intérêt biologique de ces éléments :

- Les carences en **magnésium** jouent un rôle clé dans l'ostéoporose. En effet, des réductions significatives de la quantité de magnésium sont attestées dans l'os de patients ostéoporotiques⁵¹. Ces observations sont corrélées avec d'autres études rapportant une augmentation de la masse osseuse chez des patientes ostéoporotiques après une année de régime riche en magnésium⁵².
- La faible adhésion cellulaire à la surface d'un implant orthopédique peut causer un rejet de celui-ci. Or il a été démontré que le **magnésium** stimulait l'adhésion des cellules osseuses humaines, notamment les ostéoblastes⁵³, prévenant ainsi le rejet de l'implant.
- Le **zinc** stimule la croissance et la minéralisation de l'os⁵⁴, notamment par son action directe sur la différenciation et la prolifération des ostéoblastes⁵⁵, et son effet inhibiteur potentiel sur les ostéoclastes.⁵⁶
- le **zinc** est aussi connu pour modifier la production de cytokines, ces dernières étant intimement liées aux réponses immunitaires.⁵⁷

L'intégration de ces ions lors de la synthèse du matériau initial permettrait leur relargage lors de la dissolution du verre (Etape 1, Figure 2-2) dans des concentrations physiologiquement intéressantes, améliorant ainsi localement ses propriétés de bio-intégration et de bioactivité.

2.2.2 Propriétés texturales

2.2.2.1 Mésoporosité

Durant les dix dernières années, les matériaux mésoporeux (taille des pores comprise entre 2 et 50 nm) ont été largement étudiés comme systèmes pour la délivrance de substances d'intérêt. Ces 'systèmes' permettent le relargage dans le corps de molécules actives. Dans le cas de la reconstruction osseuse, l'implantation de tels matériaux comporte plusieurs avantages par rapport à une administration classique (voie orale par exemple). En effet, l'intérêt de ces matériaux réside dans le contrôle spatial et cinétique de la libération des molécules⁵⁸ : ils possèdent une meilleure efficacité de délivrance (libération locale), ce qui implique une toxicité réduite, et ils fournissent une action continue, entraînant ainsi un désagrément moindre pour le patient. Plusieurs groupes travaillent sur des carbones, des biocéramiques, ou des polymères mésoporeux, mais les silices mésoporeuses, restent les plus étudiées pour la délivrance de médicaments, notamment par Vallet-Regi⁵⁹. Plusieurs types d'agent thérapeutiques peuvent être intégrés à ces dernières : des anti-tumoraux, (actinomycine D, mitoxandrone⁶⁰), des antibiotiques (nitrofurazone⁶¹, amoxicilline⁶²) et des anti-inflammatoires (ibuprofène⁶³). Différents paramètres peuvent modifier l'adsorption des molécules, puis leur désorption, tels la taille, la forme, la distribution⁶⁴ ou la fonctionnalisation de surface⁶⁵.

Outre la libération de molécules, la mésostructuration appliquée aux verres bioactifs revêt un intérêt purement physico- chimique. En effet, elle induit un accroissement significatif de la surface spécifique, ce qui a priori peut affecter les cinétiques et amplitudes des réactions décrite précédemment. Dans notre cas, seules les propriétés physico-chimiques du verre mésostructurées seront étudiées.

2.2.2.2 Macroporosité

La macroporosité des substituts osseux et son influence sur l'ostéointégration ont surtout été étudiées pour des mousses de verres bioactifs⁶⁶, de phosphates de calcium⁶⁷ ou de polymères⁶⁸. Ces travaux démontrent que la macroporosité est synonyme d'excellente ostéoconduction. La taille, la forme, la distribution ou la tortuosité des macropores entrent en jeu. Cependant on peut dégager deux contributions principales :

- Les grands macropores (100 à 700 μm) sont un support à la colonisation des cellules osseuses dont les ostéoblastes, qui synthétisent l'os néoformé et facilitent ainsi son interpénétration avec l'implant⁶⁵.

- Les petits macropores dont la taille se situe autour du micromètre jouent un rôle complémentaire. Ils permettent la circulation rapide et turbulente des fluides, vecteurs de nutriments et de facteurs hormonaux à destination de cellules. Hing et *al.* ont notamment démontré qu'un grand pourcentage de porosité dont la distribution est micronique, favorise l'angiogénèse (croissance de nouveaux vaisseaux sanguins ou néo-vascularisation)⁶⁹. La macroporosité appliquée aux verres permettrait de plus une bioactivité tridimensionnelle et non plus seulement de surface (couche d'hydroxyapatite).

Dans la suite de ce manuscrit, la synthèse et la caractérisation des verres dopés, en magnésium ou en zinc, mésoporeux ou macroporeux seront décrites. Un des objectifs de cette thèse est de décrire l'impact de ces différents paramètres, non pas sur les propriétés biologiques, mais sur les réactions physico-chimiques induites pendant l'immersion dans un milieu physiologique, ce qui est le présupposé indispensable à de futures études cellulaires *in vitro* et aux études *in vivo*.

Partie 2 : Elaboration des matériaux d'intérêt

Chapitre 3 Homogénéité chimique du dopage via la méthode sol-gel

3.1 La voie sol-gel

3.1.1 Définition

Le procédé sol-gel est une voie de synthèse et de mise en forme de matériaux céramiques, basée sur une polymérisation inorganique en solution. Les précurseurs de cette polymérisation consistent en des centres métalliques ou métalloïdes entourés de ligands qui peuvent être de natures variées. Parmi les précurseurs les plus utilisés, on peut citer les alkoxydes de la forme $M(OR)_z$, où M est le métal ou le métalloïde et R un groupement alkyl (C_nH_{2n+1}). Les matériaux synthétisés dans le cadre de la thèse sont majoritairement formés par un réseau silicaté. Il est donc naturel de s'intéresser au cas particulier et très largement étudié du silicium. Un des précurseurs principal du silicium est le Tétrahétoxyasilane (TEOS), dans lequel les groupements alkyls correspondent à des groupements ethyls ($-CH_2-CH_3$).

D'un point de vue spatial, La polymérisation des précurseurs conduit dans un premier temps à l'obtention d'un **sol**. Le sol est une suspension colloïdale de particules solides (1-200 nm) dans un liquide. Dans notre cas, il s'agit de particules formées, après hydrolyse et condensation des précurseurs (mécanismes détaillés plus bas).

Lorsque la fonctionnalité des précurseurs, c'est-à-dire le nombre de liaisons qu'ils sont susceptibles de former, est supérieure à 2, elle permet une polymérisation tridimensionnelle. La taille que peuvent atteindre les macromolécules ainsi formées n'est donc pas limitée, et lorsqu'elle atteint une dimension macroscopique au sein de la solution, le système est alors appelé un **gel**. Un gel est donc une substance qui contient un '*squelette solide continu, dans lequel est emprisonné une phase liquide continue*'⁷¹. Différents traitements thermiques permettent par la suite l'élimination des solvants de la réaction et la maîtrise de la densification pour obtenir un matériau final aux propriétés contrôlées.

Le principal intérêt de la chimie sol-gel réside dans l'alternative qu'elle propose aux méthodes de synthèse 'haute température' coûteuses en énergie et limitées aux structures denses. Ce concept de chimie douce, introduit par Jacques Livage,⁷⁰ a ainsi permis d'élargir le champ des possibles, dans la conception de nouveaux matériaux, tant par leur nature (inorganiques, hybrides), que par leur mise en forme (film mince, poudre, nanocristallites, matériaux poreux, monolithes), ou leurs applications (optique, électronique, santé, catalyse...)

Dans les paragraphes suivants, les mécanismes mis en jeu lors de la chimie sol-gel seront présentés. Certains paramètres influant sur ces derniers seront aussi abordés. Ces généralités sont principalement inspirées de l'ouvrage 'Sol-Gel Science' de Brinker et Scherer⁷¹ qui propose une description exhaustive de ces procédés.

3.1.2 Mécanisme d'hydrolyse-condensation des alkoxydes de silicium

3.1.2.1 Hydrolyse

Lors de cette première réaction, des fonctions hydroxyles sont formées autour du cation métallique, rendant ainsi le précurseur plus réactif à la réaction de condensation. Elle est définie par l'équation-bilan suivante : $M(OR)_n + x H_2O \rightarrow M(OR)_{n-x}(OH)_x + x ROH$

L'hydrolyse (Figure 3-1) débute par une substitution nucléophile (étape 1) sur l'atome de silicium avec un transfert de proton (étape 2) ; et un groupement alkyl est alors éliminé sous la forme d'un alcool (étape 3). La réaction d'hydrolyse est d'autant plus favorisée, que :

La molécule entrante est nucléophile, $\delta(H_2O) > 0$

Le centre métallique est électrophile, $\delta(O) < 0$; $\delta(M) > 0$

Le groupe partant est nucléofuge, $\delta(ROH) > 0$

Il faut noter qu'alkoxydes et eau ne sont pas miscibles. Par conséquence, ces réactions ont lieu dans un solvant commun, qui correspond de manière générale à l'alcool généré au cours de l'hydrolyse.

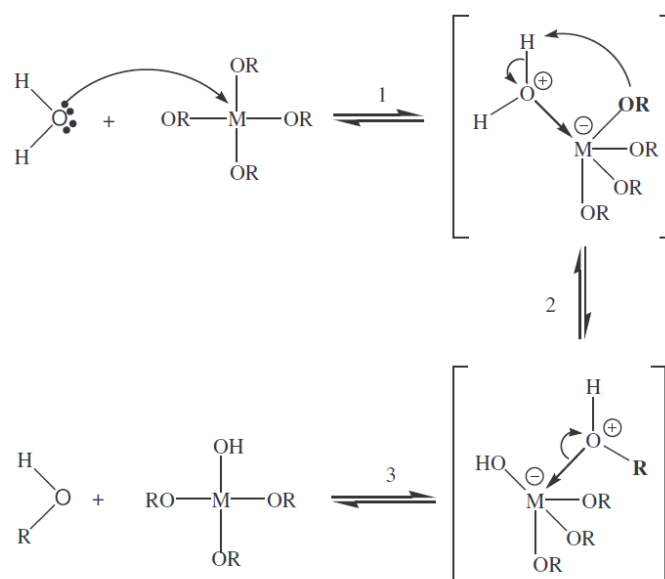


Figure 3-1 : Mécanisme d'hydrolyse des alkoxydes métalliques $M(OR)_n$

3.1.2.2 Condensation

Après l'hydrolyse totale ou partielle des alkoxydes, ces derniers peuvent réagir entre eux, via des réactions de substitution nucléophiles (les ligands hydroxyles (-OH) sont de bons groupes nucléophiles), et ainsi permettre la croissance de chaînes puis d'un réseau inorganique tridimensionnel grâce à la formation de ponts siloxanes (Si-O-Si). Cette réaction de propagation est appelée condensation. Cette 'polymérisation' souvent concomitante avec l'hydrolyse, est complexe car plusieurs mécanismes peuvent entrer en compétition. L'importance relative de chacun des mécanismes dépend des conditions expérimentales. Dans le cas du silicium, deux réactions de polycondensation entrent en jeu : alkoxolation et l'oxolation.

a) L'**alkoxolation** a lieu entre deux alkoxydes dont l'un seulement a été partiellement hydrolysé : $(RO)_{n-x}M(OH)_x + M(OR)_n \rightarrow (RO)_{n-x}(OH)_{x-1}M-O-M(OR)_{n-1} + ROH$

Son mécanisme réactionnel Figure 3-2 est semblable à celui de l'hydrolyse.

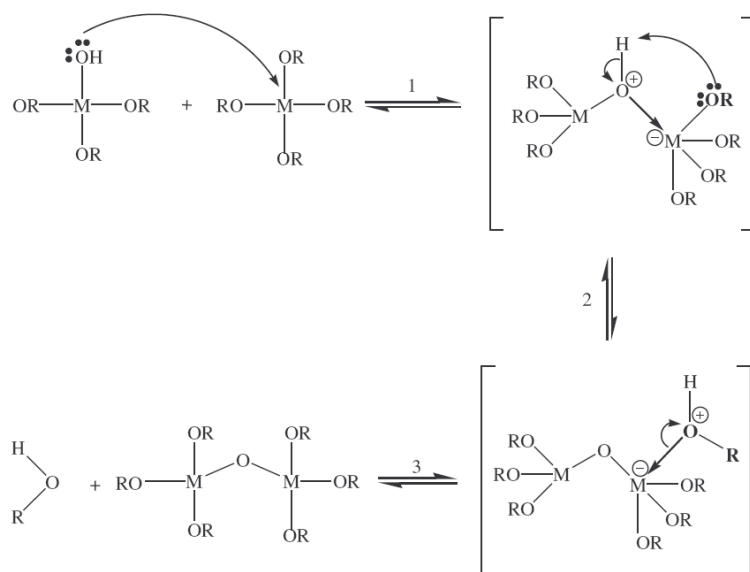


Figure 3-2 : Mécanisme d'alkoxolation des alkoxydes métalliques $M(OR)_n$

b) Dans le cas de l'**oxolation**, et contrairement à l'alkoxolation, les deux alkoxydes sont hydrolysés : $(RO)_{n-x}M(OH)_x + (RO)_{n-y}M(OH)_y \rightarrow (RO)_{n-x}(OH)_{x-1}M-O-M(OH)_{y-1}(OR)_{n-y} + H_2O$

Le mécanisme est proche de l'alkoxolation (Figure 3-3), la différence résidant dans la nature du groupe partant, alcool pour l'alkoxolation et eau pour l'oxolation.

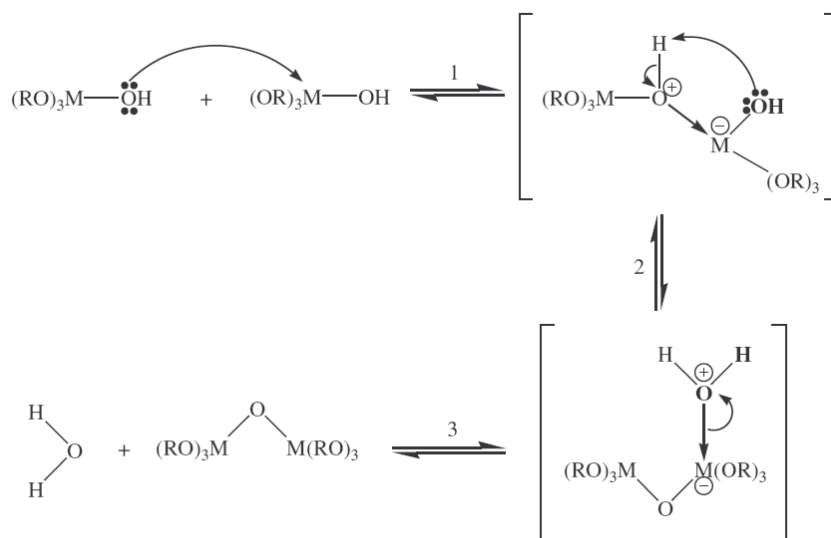


Figure 3-3 : Mécanisme d'oxolation des alkoxydes métalliques $M(OR)_n$

3.1.3 Evolution physique d'un système sol-gel : croissance des sols, gélification, vieillissement

Au-delà des mécanismes réactionnels, le procédé sol-gel permet, comme son nom l'indique, l'évolution d'une phase liquide vers une phase solide à travers différentes étapes. L'objectif de ce paragraphe est la description de ces étapes en s'appuyant sur leur représentation schématique (Figure 3-4)

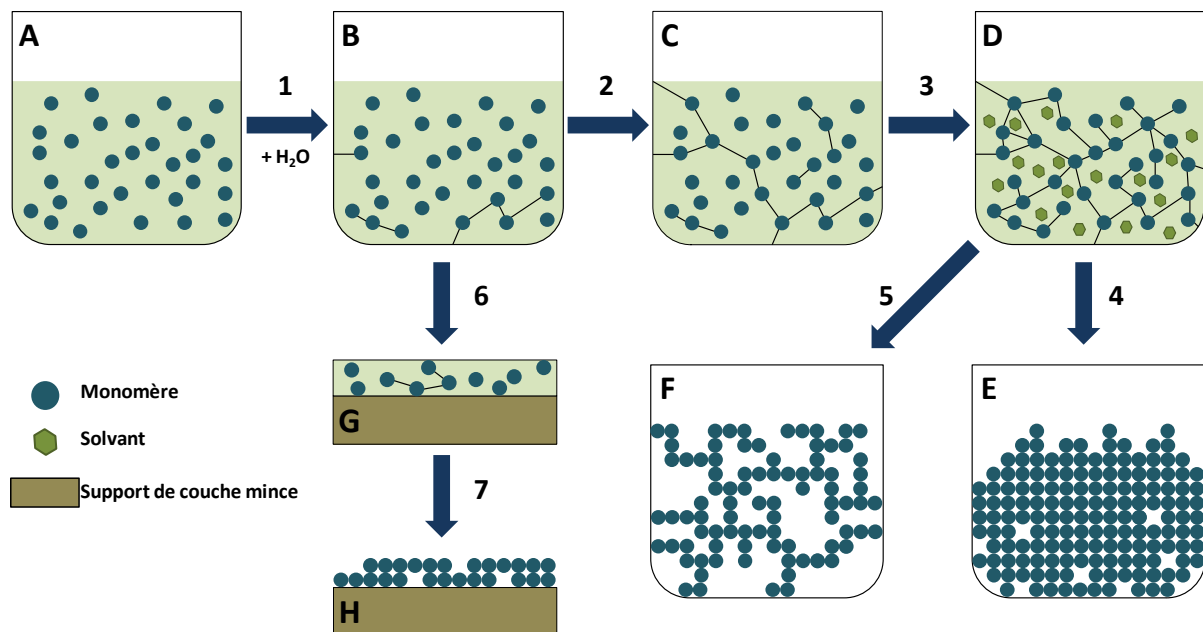


Figure 3-4 : Evolutions possibles d'un système durant la transition sol-gel.

Dans l'étape initiale (A), le système est constitué d'alkoxydes en solution. L'adjonction d'eau (1) initie les réactions d'hydrolyse puis de polymérisation. Des oligomères et polymères sont donc formés en solution (B). La viscosité de la solution augmente jusqu'à l'obtention d'un gel, au temps t_{gel} (temps nécessaire à l'obtention du gel après l'ajout d'eau dans les conditions considérées) (C).

La notion de 'gel' est valable uniquement d'un point de vue macroscopique ; lorsque la viscosité du système tend vers l'infini. A l'échelle moléculaire, aucun phénomène nouveau ne marque la transition sol / gel : le maillage du gel est très lâche après le point de gélification, et

les espèces non liées au gel peuvent toujours diffuser et réagir (polymérisation, greffage au réseau...)

L'étape suivante est le vieillissement ou maturation du gel (3). Son maillage devient alors plus dense par greffages successifs : les molécules, mais surtout les macromolécules diffusent beaucoup plus difficilement. A l'issue de cette étape, qui peut durer plusieurs ' t_{gel} ', il est possible d'observer une expulsion du solvant (synérèse).

Les propriétés texturales du solide final dépendent fortement de l'étape suivante : le séchage (4-5). Si le gel est séché en conditions douces, il se densifie et est alors qualifié de xérogel (E). Nous avons choisi cette voie par séchage 'doux' car elle permet d'obtenir des verres et des céramiques compacts. L'autre option est le séchage en conditions supercritiques (5), avec une vitesse d'évaporation importante et constante. Un gel très peu dense en est issu : l'aérogel (f)

Enfin, il convient d'ajouter que l'élaboration de films ou de couches minces de xérogel (h) est possible via les techniques de spin-coating et dip-coating, lorsque le système est encore à l'état de sol (6).

3.1.4 Paramètres influençant les synthèses sol-gel siliciques

3.1.4.1 Catalyse

Pour les réactions faisant intervenir des précurseurs de silicium, l'emploi d'un catalyseur est souvent nécessaire. En effet dans ces molécules, l'atome de silicium est assez peu sensible aux attaques nucléophiles en raison de sa faible charge partielle ($\delta=+0,32$). Les alkoxydes de silicium sont donc peu réactifs et nécessitent une catalyse. Ces dernières sont généralement de deux types, acides et basiques. Elles influencent non seulement les mécanismes, mais aussi la texture finale du matériau.

a) Effets sur l'Hydrolyse

La réaction d'hydrolyse est fortement accélérée par l'ajout d'un catalyseur acide ou basique. Lors de la catalyse **acide**, la protonation des groupements alkoxydes chargés négativement est rapide, augmentant ainsi le caractère nucléofuge du groupe partant, ce qui induit une diminution de la densité électronique associée au silicium. Par conséquent, les attaques nucléophiles par les molécules d'eau sont favorisées par le caractère électrophile du

silicium. Lors d'une catalyse **basique**, l'ion hydroxyde remplace l'eau comme agent nucléophile et accélère la première étape réactionnelle en raison de sa plus grande réactivité. Pour les mêmes concentrations en catalyseur, la catalyse acide permet une hydrolyse plus rapide. En effet, au début de l'hydrolyse, les groupements alkoxydes autour du silicium tendent à repousser les attaques nucléophiles de l'ion hydroxyde. L'hydrolyse des groupements alkoxydes annihile cet effet.

b) Effets sur la condensation et conséquences sur la morphologie

La texture du gel final peut varier de façon significative en fonction du mode de croissance du réseau inorganique. Or la polymérisation des alcoxydes de silicium est fortement influencée par le pH. Le comportement de la silice en fonction du pH comporte deux zones remarquables :

pH=2 : le point isoélectrique (pH pour lequel le potentiel zêta est égal à 0) et le point de charge nulle de la silice se trouvent tout deux situés à proximité de ce pH. Lorsque $\text{pH} < 2$, les particules portent une charge positive et au contraire, à $\text{pH} > 2$ la charge de surface est positive.

pH=7 : la solubilité de la silice est maximale pour ce pH. De plus, le caractère ionisé de la silice devient très marqué au dessus de ce pH. Iler distingue alors 3 domaines⁷² :

pH<2 : dans ce domaine, l'hydrolyse est beaucoup plus rapide que la condensation et la solubilité des différentes espèces est relativement faible. En conséquence, avant que la condensation n'ait réellement débuté, l'ensemble des précurseurs ont été hydrolysés et sont disponibles (réactifs) pour la formation de petites particules (diamètre < 1 nm). Ces particules sont soumises au mouvement Brownien et réagissent de façon irréversible et immédiate dès qu'elles rencontrent une autre particule. Ainsi, des amas polymériques extrêmement ramifiés (peu denses) composés de très petites particules sont formés peu à peu et s'agrègent à leur tour suivant un mode d'agrégation « *amas-amas* ». La croissance des agrégats n'est limitée que par leur capacité à diffuser dans le milieu. Le gel final présente une structure polymérique avec une dimension fractale assez basse (~ 2) caractéristique d'un réseau poreux dont les échelles de taille allant du microscopique (< 2 nm) au macroscopique (> 50 nm).

pH>7 : la cinétique de condensation est plus rapide que l'hydrolyse et les espèces sont très solubles. De plus, pour ces pH, les amas polymériques sont ionisés et donc mutuellement répulsifs ce qui limite fortement l'agrégation « *amas-amas* ». Dans ces conditions, la

croissance se développe principalement par l'addition de monomères à des amas préformés. Ce mode de croissance est qualifié de « monomère/amass ». En outre, la bonne solubilité des petites particules favorise leur dissolution et leur reprecipitation sur de plus grands amas. A l'échelle d'un amas, cette bonne solubilité permet aux nanoparticules situées à l'interface amas/solvant de se réorganiser de façon à minimiser l'énergie interfaciale, ce qui induit la formation de structures colloïdales beaucoup plus denses que celles observées à pH acide. Il faut noter que ces conditions de synthèse permettent la formation de dispersions colloïdales métastables et monodisperses (de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres). L'aggrégation des particules ainsi formées peut être obtenue par écrantage électrostatique (floculation) ou par passage à pH acide. Le gel final présente en général une dimension fractale assez grande (structure euclidienne plutôt que fractale) mais cet aspect dépend en partie d'autres facteurs tels que la force ionique au moment de la gélification.

2<math>pH<6</math> : dans cette zone de pH, la cinétique de condensation est proportionnelle à la concentration en ions hydroxydes. De plus, les ligands hydroxydes les plus aisément déprotonables sont ceux présentant un caractère acide marqué c'est-à-dire ceux situés sur des chaînes déjà condensées. Pour cette raison, la réaction de dimérisation mettant en jeu deux monomères est assez lente. Toutefois, lorsque les dimères sont formés, les réactions entre dimères et monomères puis trimères et monomères sont plus rapides. Ainsi, les réactions se développent majoritairement entre espèces fortement condensées et espèces faiblement condensées. Une fois les premiers tétramères formés les réactions de fermeture de cycle se développent sous l'effet des forces de déplétions générées par la population des monomères environnant. Au delà, ces particules continuent à croître jusqu'à des tailles comprises entre 2 et 4 nm puis leur dimension n'évolue plus en raison de la faible solubilité des espèces (pas de mûrissement d'Ostwald). Concernant l'étape d'aggrégation des particules, on peut distinguer deux cas : pour les pH situés entre 2 et 4, les particules sont faiblement chargées, et on observe un mode d'aggrégation des particules du type « amas-amass » similaire à celui rencontré pour les $pH<2$ et conduisant à des structures polymériques. Lorsque le pH est compris entre 4 et 6, le mode d'aggrégation se rapproche de celui proposé pour les $pH>7$, c'est-à-dire suivant un mode amas/monomères conduisant à un gel colloïdal.

3.1.4.2 Quantité d'eau

Le taux d'hydrolyse h peut être défini par : $h = [\text{H}_2\text{O}] / [\text{M}(\text{OR})_n]$. Trois domaines principaux se distinguent :

$h < 1$: La condensation est principalement gouvernée par l'alkoxolation. Les précurseurs de faible fonctionnalité ($f=1$) ne permettent pas la formation d'un réseau polymérique infini, mais seulement de clusters moléculaires. Aucune gélification ne peut alors se produire.

$1 \leq h < n$: Dans ce domaine, les mécanismes d'oxolation et d'alkoxolation sont en concurrence. Un réseau faiblement réticulé constitué de chaînes polymériques linéaires peut se former.

$h > n$: L'excès d'eau permet la formation d'un réseau polymérique ramifié, d'un gel ou d'un précipité.

3.1.4.3 Nature des ligands

Le comportement chimique du précurseur est très lié à la nature des ligands entourant l'atome central. Cette influence peut être soulignée à travers deux exemples :

- La cinétique d'hydrolyse décroît lorsque la taille du ligand augmente. En effet, cette augmentation de la taille entraîne une diminution de la charge partielle positive sur les centres métalliques, et la sensibilité des alkoxydes à l'hydrolyse diminue donc elle aussi.

- La fonctionnalité du précurseur peut être maîtrisée pour orienter la croissance du réseau. Ce dernier peut par exemple être linéaire lorsque le précurseur a une fonctionnalité de 2, empêchant ainsi l'interconnexion des chaînes inorganiques.

3.2 Synthèse de verres $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ et $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, dopés en Oxydes de Zinc ou de Magnésium

3.2.1 Protocole expérimental

Les matériaux étudiés sont des verres binaires $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ dopés en oxyde de magnésium et ternaires $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ dopés en oxydes de zinc ou de magnésium. Leurs propriétés seront comparées avec leurs équivalents non-dopés étudiés précédemment au sein

de l'équipe.¹⁵⁶ Les compositions massiques nominales, ainsi que celles des verres 'références' non-dopés sont données dans le tableau 3-1. Ils sont désignés suivant la norme suivante, **B75-AX** et **B67,5-AX**, de compositions chimiques respectives :

$SiO_2(75\%)-CaO((25-X)\%)-AO(X\%)$ et $SiO_2(67,5\%)-CaO((25-X)\%)-P_2O_5(7,5\%)-AO(X\%)$ exprimées en pourcentages massiques, où A est l'élément dopant (Zn ou Mg) et X = 1 ou 5.

	B75	B67, 5	B 67,5-Zn1	B 67,5-Zn5	B 75-Mg1	B 75-Mg5	B 67,5-Mg1	B 67,5-Mg5
SiO ₂	75	67,5	67,5	67,5	75	75	67,5	67,5
CaO	25	25	24	20	24	20	24	20
P ₂ O ₅	0	7,5	7,5	7,5	0	0	7,5	7,5
ZnO	0	0	1	5	0	0	0	0
MgO	0	0	0	0	1	5	1	5

Tableau 3-1 : Compositions théoriques des verres étudiés (%massique).

Ces verres ont été élaborés sous forme de poudres et leur synthèse s'inspire d'un article de Saravanapavan et Hench.⁷³ Les étapes chronologiques du protocole, décrites Figure 3-5 sont les suivantes :

Préparation du sol : Les précurseurs (Tableau 3-2) sont des alkoxydes (Si, P) ou des nitrates (Ca, Zn, Mg). La réaction est catalysée par de l'acide chlorhydrique 2M. Par ailleurs, le TEOS n'étant pas miscible avec l'eau, son alcool parent, l'éthanol a été utilisé en tant que solvant. Les rapports molaires et volumiques entre les réactifs et solvant sont présentés dans le Tableau 3-3.

	Formule	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Pureté (%)
Tétraéthoxysilane TEOS	Si-(OC ₂ H ₅) ₄	208,33	99,999
Triéthylphosphate TEP	O=P(OC ₂ H ₅) ₃	182,16	99,8
Nitrate de calcium tétrahydraté	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236,15	99,99
Nitrate de magnésium hexahydraté	Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	256,41	99,99
Nitrate de zinc hexahydraté	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	297,46	99,995

Tableau 3-2 : Caractéristiques des précurseurs utilisés.




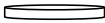






Le rapport molaire $\text{H}_2\text{O}/(\text{TEOS}+\text{TEP})$ est égal à 12 pour toutes les synthèses. Ce large excès d'eau permet d'hydrolyser totalement les alkoxydes, afin qu'ils aient une fonctionnalité maximum, synonyme de réticulation en trois dimensions. Les rapports molaires $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ et $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ ont respectivement été fixés à 6 et 1. Eau, acide et éthanol sont mélangés dans un ballon sous agitation magnétique pendant 15 minutes. Le TEOS est alors ajouté au mélange et, après 30 minutes, le TEP y est versé. Au bout de 20 minutes, le nitrate de calcium et/ou le précurseur du dopant sont introduits. La solution est alors agitée 60 minutes supplémentaires. Des particules primaires de l'ordre du nanomètre sont formées lors de cette étape si elle est réalisée en catalyse acide.⁷⁴

$\text{H}_2\text{O}/(\text{TEOS} + \text{TEP})$	$R_{\text{molaire}} = 12$
$\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$	$R_{\text{volumique}} = 6$
$\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$	$R_{\text{volumique}} = 1$

Tableau 3-3 : Proportions d'eau d'éthanol et d'acide chlorhydrique.

Gélification et vieillissement : Cette étape est réalisée à une température de 60°C dans un récipient en Téflon, durant 24h. Lin et al. ont démontré qu'au début de cette étape, le milieu est une suspension colloïdale.⁷⁵ Les particules secondaires de silice ont un diamètre moyen de 5 nm. Les ions issus des précurseurs nitrates (Ca^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+}) ne sont pas encore intégrés dans le réseau silicaté : ils sont alors dissous dans le sol avant la transition sol-gel et dans le liquide contenu dans les pores après le temps de gélification (Figure 3-6/A). Ces observations démontrent que l'utilisation d'un récipient en Téflon est primordiale. En effet, la surface hydrophobe du Téflon prévient l'accumulation des espèces ioniques à la surface du gel, inhibant ainsi la nucléation de nitrate (de calcium par exemple) à la périphérie durant l'étape de séchage.⁷⁶

Séchage : L'étape de séchage permet l'évaporation des solvants (eau, éthanol). Le gel est transféré dans un verre de montre. Durant le traitement, qui s'effectue à 125°C durant 24h, le retrait du gel est dû à la réduction des espaces interstitiels entre les particules secondaires, à mesure que le sol s'évapore. Cette diminution des espaces interstitiels permet l'agrégation des particules grâce à la condensation des groupements OH de surface. A l'issue de cette étape, les ions calcium, zinc, magnésium et nitrate se situent à la surface des particules de silice secondaires (Figure 3-6/B)

Sol	Gélification & Vieillessement	Séchage	Calcination
			
T° ambiante	60°C	125°C	700°C
2h	24h	24h	24h
Précurseurs  Particules primaires	 Particules secondaires  Point de Gélification  Gel hydraté	 Agrégation des particules secondaires	 Densification

(a)

(b)

(c)

(d)

Figure 3-5 : Principales étapes de la synthèse de verres binaires et ternaires dopés. – Evolution des ‘unités structurales’.

Calcination : L’objectif de cette étape est double. Premièrement, à partir de 300-400°C, la décomposition des nitrates a lieu. Deuxièmement, à partir de 600°C, intervient la densification pendant laquelle le réseau 3D macroscopique est formé (Figure 3-5). Cette étape est rendue possible grâce à la fusion des particules secondaires, via un flux visqueux du à la température relativement haute du traitement thermique. Ce ‘flux visqueux’ possède un intérêt majeur : il permet l’incorporation des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} dans le réseau vitreux (Figure 3-6/C). L’homogénéité chimique conférée à des précurseurs en solution est ainsi transmise au solide. Cette propriété est primordiale car nos verres sont étudiés via la répartition spatiale de leurs éléments constitutifs. Dès lors, les différences mises en évidence par les cartographies chimiques peuvent être attribuées uniquement aux réactions du matériau avec le milieu biologique.

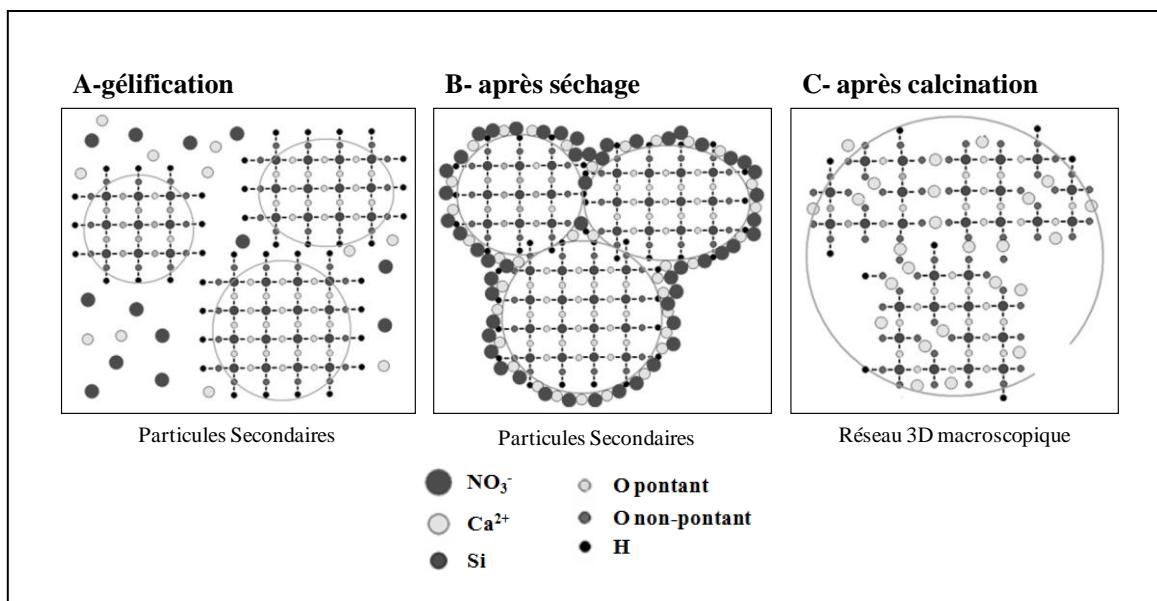


Figure 3-6 : Evolution de la distribution du calcium au cours des étapes de synthèse.⁷³

3.2.2 Vérification des compositions par ICP-AES

3.2.2.1 Principe et mesure

La composition de chaque verre est contrôlée par spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif ou ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy*). Cette méthode d'analyse est dédiée au dosage d'éléments en solution, notamment les éléments traces, puisque sa sensibilité peut être inférieure au ppm. Cette technique est applicable à des échantillons liquides. Un aérosol de cette solution est ensuite injecté au sein d'un plasma d'argon dont la température avoisine les 10 000 °C. Cette température très élevée permet la dissociation de la matière en atomes et ions libres dont les électrons périphériques sont excités. Leur retour à l'état fondamental stable est accompagné d'une émission de photons dans l'ultraviolet et le visible. Ce rayonnement, dont les longueurs d'onde sont caractéristiques des éléments constitutifs de l'échantillon, est décomposé au moyen d'un réseau de diffraction. La détection et le comptage des photons permettent une quantification, par comparaison entre le signal mesuré pour l'échantillon et celui obtenu pour des solutions étalons. L'ensemble de la procédure analytique est validée par des tests sur des matériaux de référence certifiés.

Concernant l'instrumentation, la torche à plasma est constituée par un tube de quartz entouré de plusieurs spires d'induction en cuivre, connectées à un générateur de radiofréquence de 30 MHz. L'ionisation du flux d'argon circulant à l'intérieur de la torche est amorcée par la décharge d'une bobine. Les ions et les électrons ainsi créés interagissent avec le champ magnétique produit par les spires, ce qui contraint les ions et les électrons à décrire une trajectoire circulaire à vitesse élevée. Un échauffement par effet Joule résulte de leur résistance à ce mouvement, permettant d'atteindre une chaleur de plasma extrêmement élevée.

L'ICP-AES possède plusieurs avantages par rapport aux autres spectroscopies d'émission. Tout d'abord, des spectres d'émission de qualité sont obtenus pour la plupart des éléments dans les mêmes conditions d'excitation, autorisant l'analyse multiélémentaire. D'autre part, la température de travail plus élevée a pour conséquence un faible niveau d'interférences. Enfin, les sources à plasma permettent le dosage d'éléments traces qui ont tendance à former des composés réfractaires, tels les oxydes de bore, ou de phosphore.

Comme précisé plus haut, les échantillons à analyser doivent se présenter sous forme liquide. Nos poudres de verres nécessitent donc d'être mises en solution. Dans ce but, une fusion alcaline est tout d'abord réalisée (mélange de 500 mg de métaborate de lithium LiBO_2 et de 100 mg d'échantillon, chauffé à 1100 °C). Une perle de consistance visqueuse est obtenue, puis dissoute dans 200 mL d'acide nitrique à 1 mol/L afin de réaliser une solution limpide susceptible d'être nébulisée dans le spectromètre. Des solutions étalons, dont les concentrations atomiques en éléments sont connues, sont nécessaires à la calibration de l'appareil.

3.2.2.1 Composition des verres dopés

Les résultats de l'analyse ICP-AES des verres dopés sont présentés dans le Tableau 3-4. Ces compositions sont conformes aux valeurs nominales (Tableau 3-1).

	B 67,5-Zn1	B 67,5-Zn5	B 75-Mg1	B 75-Mg5	B 67,5-Mg1	B 67,5-Mg5
SiO₂	68,54 ± 0,69	66,19 ± 0,65	73,09 ± 0,73	73,62 ± 0,74	66,09 ± 0,66	66,41 ± 0,66
CaO	23,67 ± 0,24	20,37 ± 0,21	25,85 ± 0,26	21,54 ± 0,22	24,67 ± 0,25	19,69 ± 0,20
P₂O₅	7,14 ± 0,07	7,51 ± 0,08	— —	— —	8,49 ± 0,08	8,05 ± 0,08
ZnO	0,82 ± 0,01	5,72 ± 0,06	— —	— —	— ± —	— ± —
MgO	— —	— —	1,06 0,01	5,18 0,05	1,07 ± 0,01	5,32 ± 0,05

Tableau 3-4 : Compositions des verres dopés mesurées par ICP-AES (%massique).

3.3 Propriétés texturales

3.3.1 Caractérisation d'un matériau micro/mésoporeux

La présente étude porte sur des matériaux poreux. Que cette porosité soit intrinsèque au procédé sol-gel (verres dopés) ou contrôlée via une stratégie de synthèse (cf. Chapitre 4 & Chapitre 5), il est impératif de caractériser cette dernière afin de conclure ultérieurement quant à son éventuelle influence sur nos résultats. La détermination de paramètres regroupés sous le terme générique de 'texture', tels la surface spécifique ou la distribution de taille des pores est primordiale pour décrire la porosité ouverte d'un échantillon. L'une des méthodes les plus usitées est l'adsorption de gaz, et plus spécialement de diazote. Cette technique est parfaitement adaptée à la description de la microporosité ($d < 2\text{nm}$), et de la mésoporosité ($2\text{nm} < d < 50\text{nm}$). D'autres méthodes propres à la macroporosité ($d > 50\text{nm}$) seront abordées ultérieurement.

3.3.1.1 Isotherme d'adsorption

L'adsorption est un phénomène qui se produit chaque fois qu'un gaz ou un liquide est en contact avec un solide ; ce dernier est retenu par les atomes superficiels du solide et se concentre à sa surface. La désorption est la libération des gaz ou vapeurs retenus par adsorption à la surface d'un solide. Deux types de forces sont responsables des interactions qui peuvent s'établir entre le solide adsorbant et le fluide adsorbable et conduisent traditionnellement à distinguer deux types d'adsorption : la **physiorption** et la **chimisorption**. La chimisorption repose sur un échange d'électrons entre la surface du solide et les molécules adsorbées : il y a donc création d'une liaison forte qui modifie les propriétés du solide. Au contraire, les interactions intervenant dans le processus de physiorption ne modifient pas l'adsorbant : ce sont des liaisons faibles de type Van der Waals. L'adsorption physique peut donc être utilisée pour caractériser la texture de matériaux. L'adsorbat que nous avons utilisé est le diazote. Cette molécule est majoritairement employée, notamment en raison de sa grande stabilité chimique.

Par analogie avec l'équilibre qui s'établit entre un liquide et sa vapeur, le diazote est en équilibre entre la phase gazeuse et la 'phase adsorbée'. Pour une température donnée, l'ensemble des états d'équilibre correspondant à des pressions comprises entre 0 et la pression de vapeur saturante de la substance adsorbable est appelé **isotherme d'adsorption** : elle est

caractéristique du couple adsorbat/adsorbant étudié. L'isotherme d'adsorption expérimental est une courbe représentant le volume de diazote adsorbé par gramme d'adsorbant en fonction du rapport pression d'équilibre du gaz adsorbable/pression de vapeur saturante, à la température considérée (Figure 3-7). Le rapport de ces deux pressions, noté p/p° , est appelé pression relative d'équilibre.

L'allure des isothermes d'adsorption physique est le meilleur révélateur des caractéristiques texturales du matériau étudié. C'est une donnée expérimentale objective qui doit être tout d'abord prise en considération avant de tenter d'obtenir des informations quantitatives. L'analyse peut en être faite à l'aide de la classification des isothermes d'adsorption physique proposé par Brunauer *et al.*⁷⁷ et reprise par l'IUPAC⁷⁸ (International Union of Pure and Applied Chemistry).

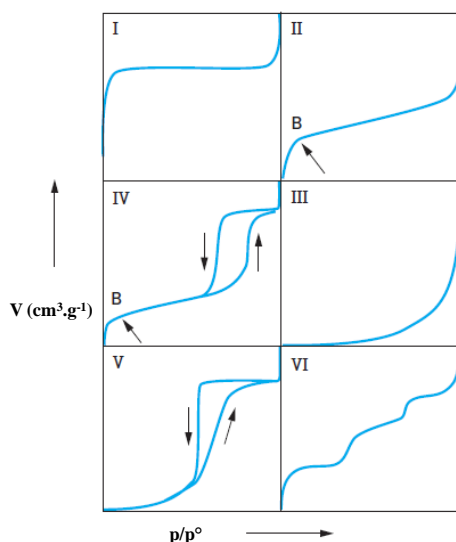


Figure 3-7 : Classification des isothermes d'adsorption physique donnée par l'IUPAC.

Le **type I** est caractérisé par l'existence d'une horizontale traduisant une saturation de l'adsorbant, malgré l'augmentation de la pression : cette isotherme est obtenue avec des adsorbants ayant uniquement des micropores qui se remplissent à des pressions d'autant plus basses que leur largeur est plus faible.

Le **type II** est caractérisé par une augmentation très progressive de la quantité adsorbée en fonction de la pression relative d'équilibre : cette isotherme est obtenue avec des adsorbants non poreux ou macroporeux à la surface desquels la couche adsorbée s'épaissit progressivement (adsorption multimoléculaire).

Le **type IV** a la même allure que le type II pour les pressions relatives les plus basses. Pour les pressions relatives les plus élevées, elle est caractérisée par un palier de saturation dont la longueur est très variable (parfois réduit à un point d'inflexion) : cette isotherme d'adsorption est obtenue avec des adsorbants mésoporeux dans lesquels se produit une condensation capillaire. La désorption de l'azote condensé par capillarité dans les mésopores n'est pas réversible : on observe généralement une hystérèse de désorption par rapport à l'adsorption. Nos matériaux étant mésoporeux, c'est principalement ce type d'isotherme d'adsorption qui nous intéressera. Les isothermes d'adsorption du **type III** et **V** sont beaucoup plus rares et n'ont pas d'intérêt direct pour nous.

Il est important de souligner qu'il s'agit d'une classification qui vise à distinguer des adsorbants typiques. En réalité, les isothermes d'adsorption physique obtenues sont généralement des isothermes d'adsorption composites révélant la complexité des adsorbants étudiés. Plusieurs modèles permettent d'extraire des isothermes les informations concernant la surface spécifique et les caractéristiques des pores. Certains d'entre eux, que nous avons utilisés, sont présentés dans les paragraphes suivants. Plusieurs ouvrages donnent une description exhaustive et une démonstration des différents modèles.^{79,80}

3.3.1.2 Surface spécifique

L'étendue de la surface d'un solide est caractérisée par son aire exprimée en m². Cette aire est habituellement rapportée à un gramme de solide, et exprimée **m².g⁻¹**. Il s'agit d'une aire massique qui est spécifique à un solide donné. Aussi par abus de langage, elle est souvent nommée surface spécifique. Le modèle de Brunauer, Emmett et Teller (**BET**) datant de 1938 permet de la calculer. D'après cette théorie, le nombre de molécules d'adsorbable requises pour couvrir la surface de l'échantillon sur une monocouche est estimé par :

$$\left(V_{ads} \cdot \frac{P_0}{P} - 1 \right)^{-1} = \frac{1}{V_{mono} \cdot C} + \left(\frac{C-1}{V_{mono} \cdot C} \right) \cdot \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

avec

V_{mono} : volume de gaz nécessaire pour recouvrir la surface du solide par une monocouche moléculaire.

V_{ads} : volume de gaz adsorbé.

P : pression de l'échantillon.

P_0 : pression de vapeur saturante l'adsorbât.

C : constante BET relative à l'enthalpie d'adsorption.

Dans l'équation (1), le terme $(V_{ads} \cdot P_0/P - 1)^{-1}$ est nommé fonction BET. Les données de l'isotherme d'adsorption sont utilisées pour calculer cette fonction. Ainsi, le tracé de la fonction BET en fonction de la pression relative P/P_0 permet d'obtenir une droite de pente $(C-1)/(V_{mono} \cdot C)$ et d'ordonnée à l'origine $1/(V_{mono} \cdot C)$, autorisant le calcul du volume de la monocouche.

Connaissant V_{mono} , la surface spécifique BET s'exprime selon :

$$S_{BET} = \frac{V_{mono} \cdot N_A \cdot A_M}{V_M} \quad (2)$$

avec

S_{BET} : surface spécifique BET.

N_A : nombre d'Avogadro.

A_M : section utile de l'adsorbât : $16,2 \text{ \AA}^2$ pour l'azote.

V_M : volume molaire de l'adsorbât liquide : $34,7 \text{ cm}^3/\text{mol}$ pour le diazote liquide.

La théorie BET se base sur la théorie de Langmuir pour faire l'hypothèse que tous les sites d'adsorption sont identiques d'un point de vue énergétique et qu'il n'y a aucune interaction entre molécules adsorbées. Ce n'est évidemment pas le cas en réalité, mais la théorie BET est en général applicable dans le domaine de pression relative compris entre 0,05 et 0,35 pour des isothermes d'adsorption au diazote de type II et IV suivant la classification de l'IUPAC.

3.3.1.3 Taille des pores

En première approximation, il est courant de supposer que les pores sont assimilables à des cylindres afin de définir un **rayon moyen** r_p tel que :

$$r_p = \frac{2V_p}{S_{BET}} \quad (3)$$

avec

V_p : Volume poreux accessible au gaz.

S_{BET} : Surface des pores considérés.

Cependant, la distribution en taille n'est pas prise en compte dans cette équation, qui peut ainsi être source d'erreurs importantes. Une méthode plus complète et basée comme le modèle BET sur les isothermes permet de décrire cette distribution pour les mésopores. Il s'agit de la méthode BJH⁸¹ (Barrett, Joyner et Halenda), qui consiste à analyser pas à pas les isothermes d'adsorption-désorption de tpe IV de diazote à 77 K. Elle nécessite essentiellement qu'il se produise un phénomène de condensation capillaire dans les mésopores. Les parois du matériau sont alors assimilées à des capillaires sur les parois desquels est condensé l'adsorbable. Un ménisque de rayon R_k se forme suite à la condensation d'une épaisseur t de gaz sur les parois d'un capillaire de rayon R_p (Figure 3-8). La loi de Kelvin, qui donne la relation entre la pression à laquelle se condense un gaz dans un capillaire et le rayon de courbure R_k du ménisque liquide formé, est supposée applicable et s'écrit :

$$P = P_0 \cdot \exp\left(-\frac{2\gamma \cdot V_M}{RT \cdot R_k}\right) \quad (4)$$

avec

γ : tension superficielle de l'adsorbât liquide à son point d'ébullition : $8,85 \cdot 10^{-7} \text{ J/cm}^2$ pour le diazote à 77 K.

T : température du point d'ébullition de l'adsorbât.

R : constante des gaz parfaits : $8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$.

Pour une adsorption de diazote à 77 K, il en résulte (avec R_k en nm) :

$$R_k = \frac{-0,415}{\log\left(\frac{P}{P_0}\right)} \quad (5)$$

Et alors le **diamètre modal** (en nm) du pore supposé cylindrique est lié au rayon de Kelvin R_k par :

$$R_p = R_k + t \quad (6)$$

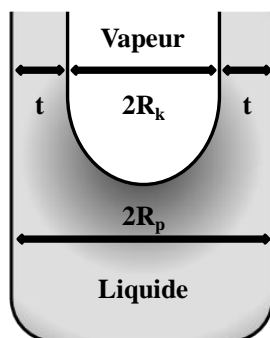


Figure 3-8 : Représentation schématique de la condensation capillaire.

L'épaisseur t de la couche multimoléculaire recouvrant la paroi du pore dépend de la pression d'équilibre selon une loi empirique (équation de Harkins-Jura) utilisée dans l'algorithme. On considère habituellement que la branche de désorption est plus représentative de l'équilibre existant entre le diazote restant à l'état gazeux et le diazote condensé par capillarité ; aussi l'algorithme BJH se base-t-il le plus souvent sur l'analyse de la branche de désorption pour le calcul pas à pas du rayon des pores. Il devient ainsi possible de tracer la distribution du volume poreux en fonction de la taille des pores et d'estimer le **diamètre modal** de pore.

3.3.2 Propriétés texturales des verres bioactifs dopés en zinc et magnésium

Les isothermes des verres dopés, présentées en Figure 3-9 amènent plusieurs remarques :

- Chacune des isothermes présente une hystérèse associée à un plateau, ce qui traduit l'existence d'une mésoporosité pour les six verres.
- L'augmentation progressive du volume dans le cas des verres ternaires (Figure 3-9 a et c) peut être le signe d'une distribution en taille importante allant de la micro à la mésoporosité, ce qui n'est pas le cas des verres binaires. L'éventualité de la présence de microporosité pour les verres ternaires est par ailleurs consolidées par la distribution de la taille des pores (Figure 3-10 a et c)
- L'hystérèse des isothermes des verres binaires (b) n'est pas fermée pour la valeur d'équilibre $P/P_0 = 1$, ce qui indique la présence de macroporosité.

- Les différences qui pourraient être induites par le dopage entre 1 et 5% sont très faibles quelque soit le verre ou l'élément dopant.

Le Tableau 3-5 résume les propriétés texturales de ces verres. Les surfaces spécifiques semblent peu affectées par le dopage en magnésium pour les verres binaires. A contrario, Les verres ternaires dopés en magnésium ou en zinc voient leurs surfaces augmenter de plus de 50% par rapport aux verres non-dopés.

La proximité des diamètres modaux et moyens des verres ternaires dopés confirme l'absence de macroporosité dans ces matériaux contrairement aux verres binaires. Le volume poreux total augmente légèrement avec le dopage pour les verres binaires. Cela pourrait s'expliquer par un diamètre de pores plus important (15,7 et 17,3 contre 8,4 nm). De manière inverse, le volume poreux des verres ternaires dopés chuterait du fait de la diminution de la taille moyenne des pores.

	B75	B67,5	B 67,5-Zn1	B 67,5-Zn5	B 75-Mg1	B 75-Mg5	B 67,5-Mg1	B 67,5-Mg5
Surface spécifique (m²/g) ± 1m ² /g	30	115	235	235	20	25	230	245
Diamètre modal (nm) ± 1nm	4,6	8,9	3,4	3,4	3,7	3,8	3,4	3,3
Diamètre moyen (nm) ± 1nm	8,4	13,2	3,2	3	15,7	17,3	3,1	2,9
Volume poreux total (cm³/g) ± 0,001cm ³ /g	0,062	0,289	0,199	0,184	0,083	0,120	0,186	0,181

Tableau 3-5 : Propriétés texturales de verres bioactifs dopés en zinc et magnésium

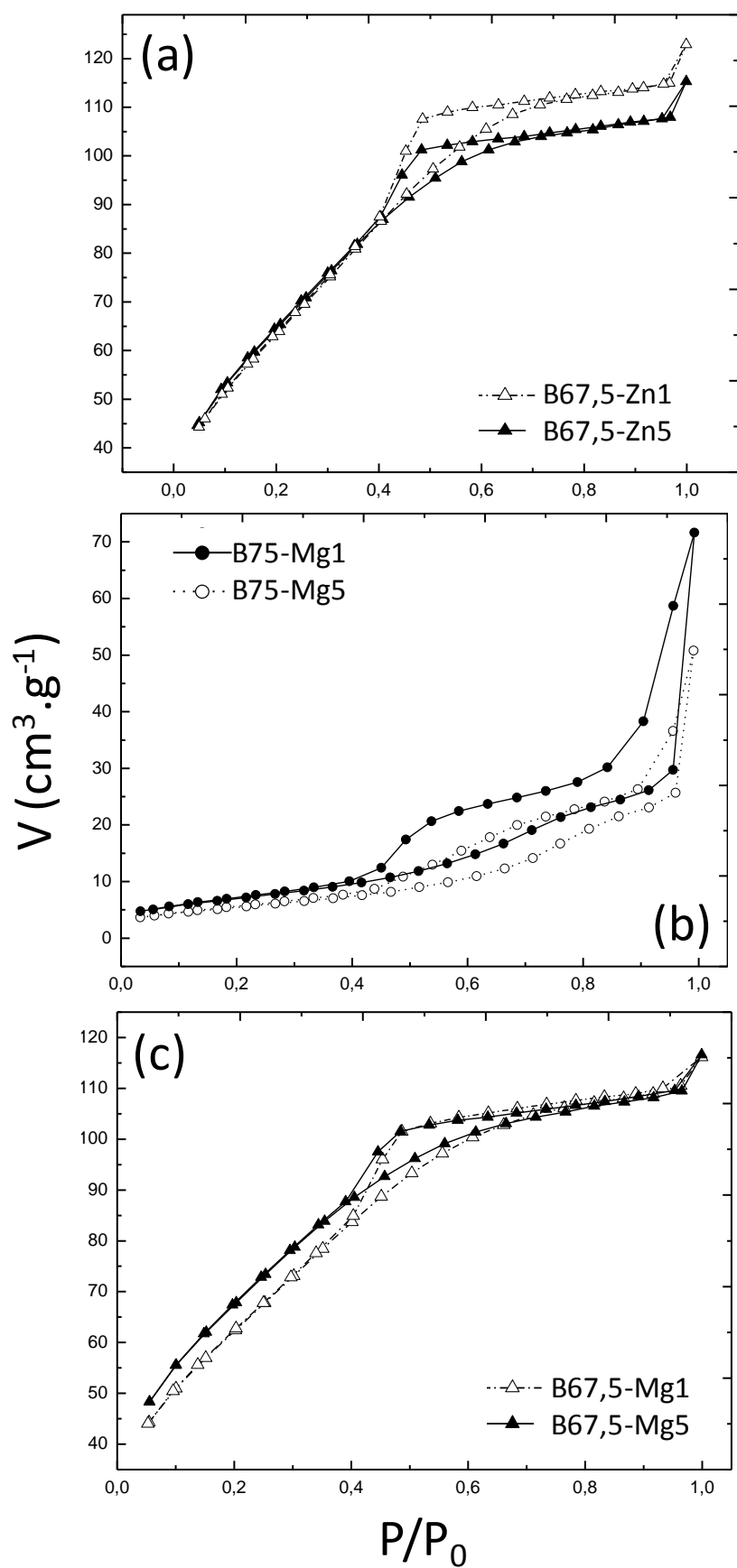


Figure 3-9 : Isothermes des verres bioactifs dopés en zinc et magnésium.

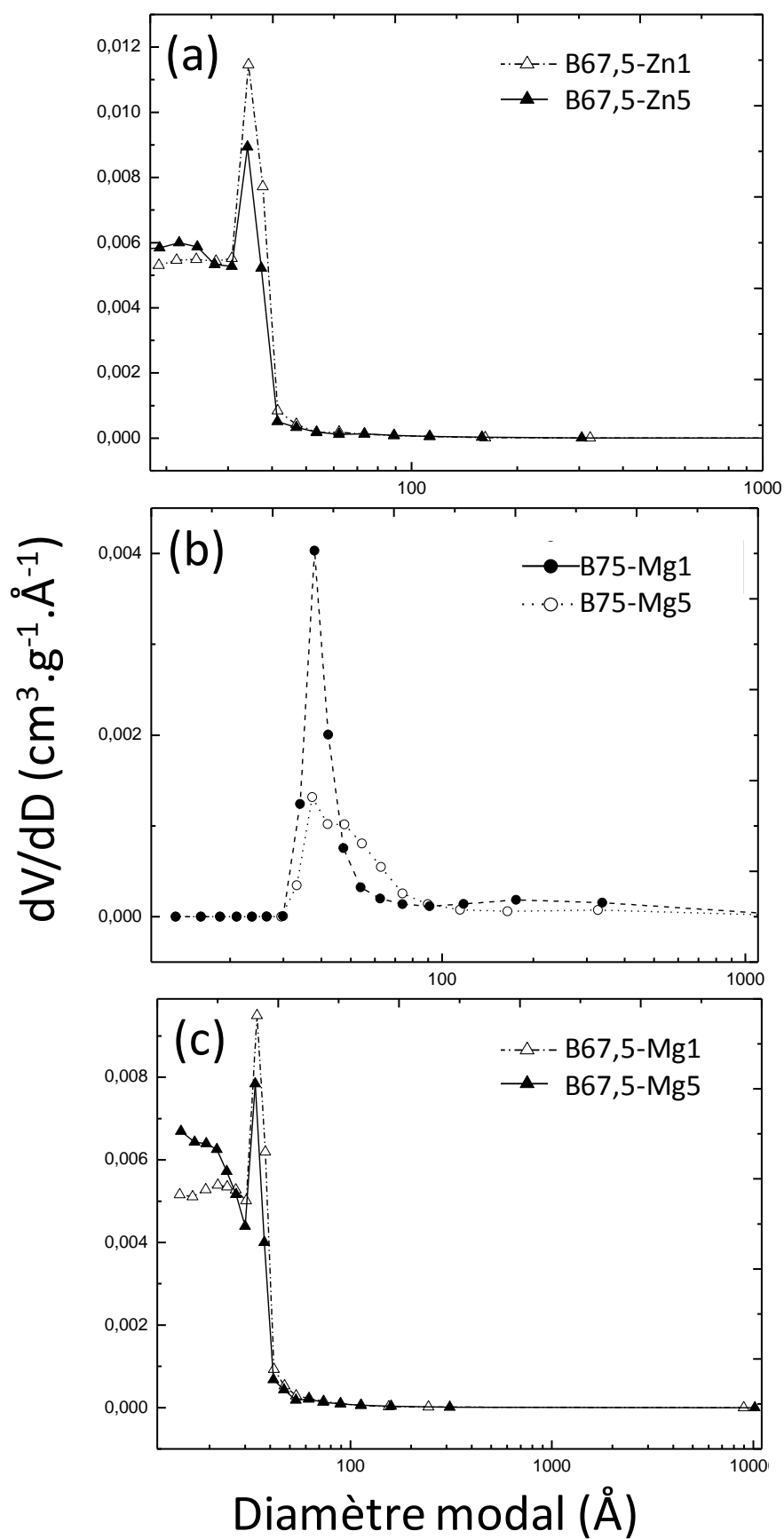


Figure 3-10 : Distribution en taille de pore des verres bioactifs dopés en zinc et magnésium.

Chapitre 4 Auto-organisation de molécules et verres mésostructurés

4.1 Principe : mésoporosité induite par des tensioactifs structurants

Les verres synthétisés par voie sol-gel ‘conventionnelle’ possèdent une mésoporosité ($2 \text{ nm} < \text{diamètre} < 50 \text{ nm}$) associé au processus lui – même. Cependant, aucun des paramètres de cette dernière, tels la distribution en taille ou la forme, ne sont maîtrisés. Si l’on veut comprendre le rôle de la mésoporosité sur les réactions physico-chimiques caractéristiques de la bioactivité, il est important de contrôler ces paramètres, afin d’établir avec précision un lien texture-propriétés. De nombreuses études traitent de tels systèmes, permettant d’organiser la mésoporosité de matériaux inorganiques : les tensioactifs structurants.

4.1.1 Tensioactifs

Les tensioactifs sont des composés capables de s’auto-assembler. Ils présentent en effet deux parties distinctes : hydrophile et hydrophobe. Les tensioactifs en solution dans l’eau sont partagés entre ces deux affinités opposées, et s’organisent spontanément de manière à minimiser leurs interactions répulsives, formant des phases micellaires isotropes. Lorsque la concentration en molécules tensioactives augmente, trois étapes sont schématiquement distinguables :

- Pour des concentrations très faibles, les molécules sont dispersées dans l’eau.
- Des micelles résultant de l’auto-association de molécules individuelles se forment à partir de la Concentration Micellaire Critique (CMC). Deux phases distinctes coexistent alors dans la solution : phase aqueuse et phase micellaire.

- Au-delà de la CMC, les micelles vont devenir de plus en plus nombreuses et s'organiser en phases ordonnées. Le volume de la phase aqueuse décroît au profit de la phase micellaire. Les micelles ayant tendance à se repousser, il va s'établir un ordre de plus en plus compact à mesure que la proportion d'eau diminue, menant à la formation de mésophases. Suivant le domaine de concentration, plusieurs géométries apparaissent : micelles sphériques ; micelles géants cylindriques, mésophases lamellaires). L'organisation de ces systèmes peut aussi différer puisque il est par exemple possible d'observer des organisations cubiques ou hexagonales.

Les corrélations existant entre ces différentes mésophases et la concentration en surfactant sont généralement représentées par un diagramme de phase composition / température (Figure 4-1). Il est spécifique de chaque tensioactif et gouverné par les surfaces, en interaction, des parties hydrophiles et hydrophobes. En effet, chaque tensioactif selon sa formule chimique et sa géométrie, pourra donner lieu à des agrégats de différentes tailles donnant lieu à diverses mésophases selon leur concentration. Les tensioactifs solubles dans l'eau sont généralement classés en deux grandes familles : ioniques et non ioniques.

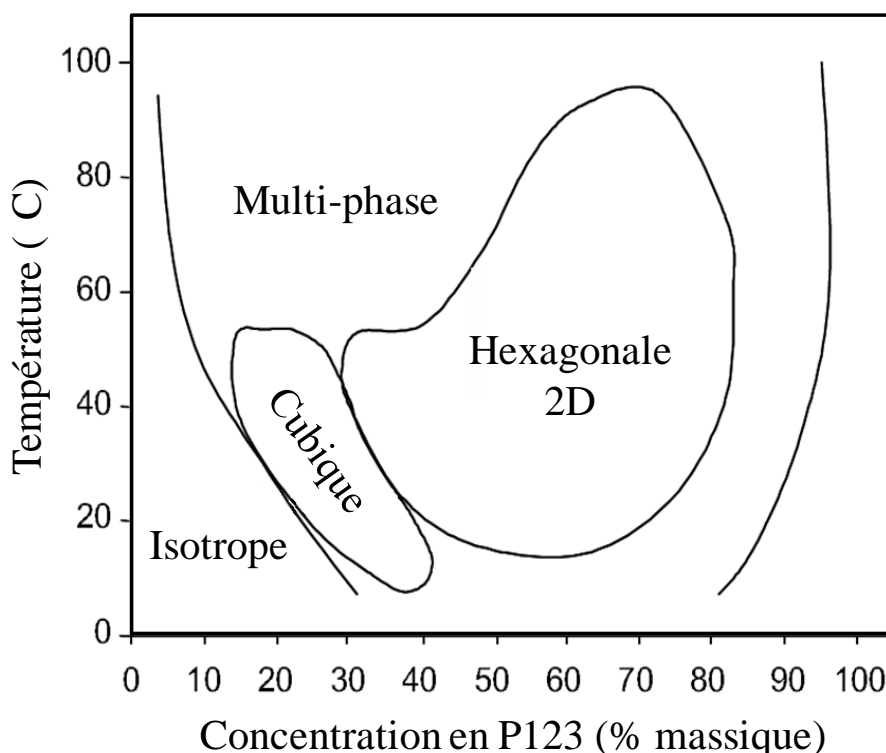


Figure 4-1 : Exemple de diagramme de phase- Mésophases du P123 en solution dans l'eau.⁸²

4.1.1.1 Tensioactifs ioniques

Ces molécules possèdent une tête chargée hydrophile et une queue hydrophobe (Figure 4-2/1). Cette catégorie se subdivise en tensioactifs anioniques (tête polaire chargée négativement) et tensioactifs cationiques (tête polaire chargée positivement). Le Bromure de Cétyle-triméthyl-Ammonium (CTAB) est un des agents porogènes les plus employés. Il est notable que le premier article traitant d'oxydes inorganiques mésostructurés et paru dans *Nature* en 1992, décrit une synthèse dans laquelle intervient le CTAB.⁸³ On peut aussi citer le cas des tensioactif zwitterioniques, qui se comportent comme des anioniques en milieu basique et comme des cationiques en milieu acide

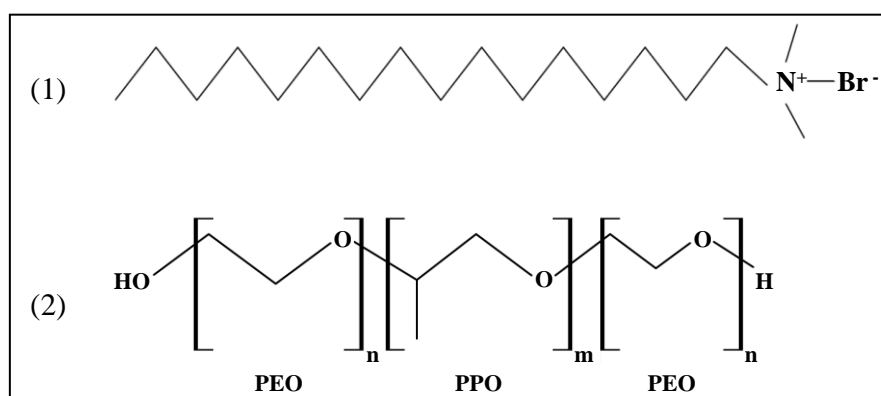


Figure 4-2 : Exemples de tensioactifs structurants- (1) Tensioactif ionique : CTAB-
(2) Tensioactif non ionique : copolymère tribloc.

4.1.1.2 Tensioactifs non-ioniques : les copolymères à bloc

Un copolymère à bloc se définit comme l'association d'au moins deux homopolymères A et B de nature chimique différente, liés entre eux par des liaisons covalentes. De manière similaire aux tensioactifs ioniques, les copolymères possèdent au moins une partie hydrophile et une partie hydrophobe et se présentent généralement sous la forme de diblocs ou de triblocs (Figure 4-3).

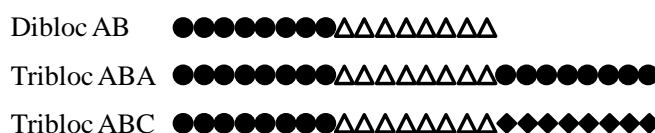


Figure 4-3 : Enchaînements de motifs possibles au sein d'un copolymère.

Parmi les copolymères les plus étudiés on peut citer les triblocs ABA de formule générale $(\text{PEO})_n(\text{PPO})_m(\text{PEO})_n$, où PEO désigne le Polyoxyde d'éthylène et PPO le Polyoxyde de propylène (Figure 4-2/2). Les tensioactifs F127 et le P123, commercialisés par BASF sont deux exemples de ces copolymères. Leurs formulations respectives sont $\text{PEO}_{99}\text{PPO}_{69}\text{PEO}_{99}$ et $\text{PEO}_{20}\text{PPO}_{69}\text{PEO}_{20}$. Ces différents tensioactifs non ioniques présentent un intérêt manifeste, sur lequel nous reviendrons ultérieurement : Le nombre de monomères au sein du cœur ou des extrémités permet d'ajuster leurs tailles, et par conséquent celle des agrégats.

4.1.1 Matériaux mésoporeux

Bien qu'une large part des publications consacrées aux matériaux mésostructurés portent sur les silices (notamment les premières concernant les surfactants ioniques⁸³ ou les copolymères⁸⁴), des oxydes métalliques mésoporeux divers sont décrits, qu'ils soient simples (Ti, Zr, Al, Nb⁸⁵) ou mixtes (Si/Ti⁸⁶, Zr/Ti⁸⁶, Zr/Si⁸⁷, Ta/Si⁸⁷), dont les précurseurs sont variés (alkoxydes, chlorures...). Cependant, le principe de synthèse reste globalement le même (figure 4-4) : Les précurseurs sont mis en solution avec des tensioactifs, dont la concentration permet de former la mésophase désirée. Les mécanismes réactionnels propres à chaque précurseur permettent de former un réseau inorganique 3D via un traitement adapté. La dernière étape permet d'éliminer l'agent porogène, principalement par calcination ou dissolution.

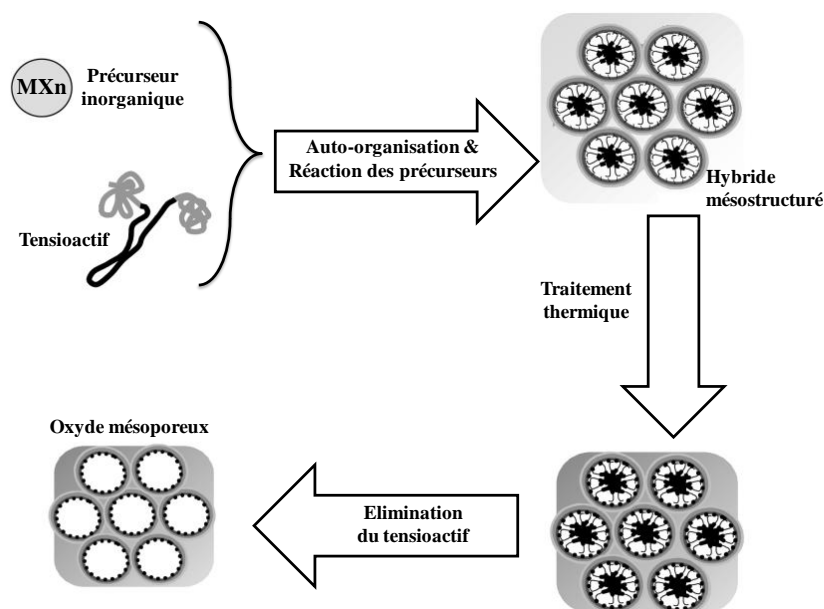


Figure 4-4 : Etapes principales de la synthèse d'un oxyde inorganique mésostructuré.⁸⁸

4.2 Elaboration de verres bioactifs mésostructurés

Quelques groupes travaillent actuellement sur les verres bioactifs, dont ceux du Pr. Zhao à l'Université de Shanghai et celui du Pr. Vallet-Regí à l'Université de Madrid. Ces équipes ont publié les premiers travaux sur la synthèse de ce type de matériaux.^{89, 90}

4.2.1 Synthèse

Le but de cette synthèse est l'élaboration de verres mésoporeux B75-F127 et B67,5-F127 de même composition que les verres non-dopés B75 et B67,5 décrits au chapitre précédent (Tableau 3-1), afin de comparer leurs propriétés (Partie 4). Les synthèses suivantes (Figure 4-5) s'inspirent en partie d'une publication de Yun et al.⁹¹

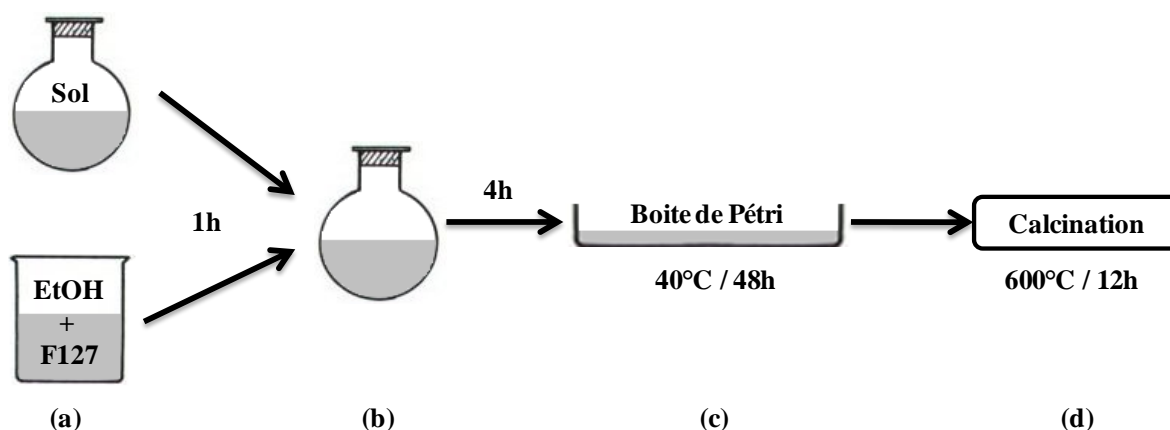


Figure 4-5 : Synthèse de verres bioactif mésostructurés.

(a) et (b) Préparation de la solution initiale. Les précurseurs de silicium, calcium et phosphore sont les mêmes (respectivement TEOS, nitrate de calcium et TEP). L'agent structurant utilisé est le F127. Le choix d'un copolymère au détriment d'un surfactant ionique s'explique principalement par une largeur accrue des murs inorganiques (15-40 Å contre 8-13 Å).⁹² Il faut par ailleurs noter que l'élimination du tensioactif est plus aisée dans le premier cas (dissociation d'une liaison hydrogène plus facile qu'une liaison électrostatique).

Les sols correspondant à chaque composition possèdent les mêmes proportions que ceux utilisés pour les synthèses sol-gel 'conventionnelles' (3.2.1, p 53). Le tensioactif F127 est quant à lui dissout dans l'éthanol. Afin de synthétiser les deux verres dans les 'mêmes' conditions, la quantité de F127 est inféodée à celles d'eau et d'alcool présents dans le sol. Il en est de même pour la quantité d'éthanol dans lequel il est dissout. En conséquence, les

quantités de matières correspondant à l'élaboration de 2,5 g de chacun des verres est donnée dans le Tableau 4-1.

	TEOS	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	TEP	Eau	HCl	EtOH (I)	F127	EtOH (II)
B75-F127	6,96 mL	2,631 g	0 mL	3,13 mL	1,04 mL	8,36 mL	2,85 g	17,92 mL
B67,5-F127	6,26 mL	2,631 g	0,45 mL	3,09 mL	1,02 mL	8,23 mL	2,80 g	17,65 mL
	S O L						Dissolution F127	

Tableau 4-1 : Composition de la solution initiale lors de la synthèse des verres bioactifs mésostructurés B75-F127 et B67,5-F127.

(c) Processus EISA. ‘L’auto-organisation induite par évaporation’ (Evaporation-Induced Self-Assembly) est une voie d’élaboration de mésophases. Initialement la concentration en tensioactif est très inférieure à la Concentration Micellaire Critique (Figure 4-6/A). L’évaporation progressive de l’éthanol puis de l’eau concomitante aux réactions des précurseurs conduit finalement à un domaine permettant la formation d’une mésophase (Figure 4-6/B). Le point A du diagramme correspond à nos conditions de synthèse. La trajectoire schématisée permet d’obtenir *in fine* une phase hexagonale. La nature de cette phase est ainsi intimement liée à la vitesse d’évaporation. Il faut par ailleurs préciser que le diagramme représente une situation ‘simple’ à trois composants : la présence de précurseurs inorganiques, notamment polaires, modifie légèrement le système. Sur un plan pratique, le processus EISA est réalisé dans une boîte de Pétri, afin d’augmenter l’interface sol/atmosphère. Un film souple et transparent, est obtenu à la fin de cette étape.

(d) Calcination. Outre les considérations similaires aux verres dopés (départ des nitrates, densification), ce traitement en température permet d’éliminer le tensioactif. Elle est effectuée à 600°C durant 12h (montée en température : 5°C/min). Les spectres infrarouges du tensioactif F127 et du verre B67,5-F127 avant et après l’étape de calcination sont présentés en Figure 4-7). Les bandes correspondant au F127 disparaissent après la calcination (par exemple $\nu_{C-H} \approx 2900 \text{ cm}^{-1}$). Ces spectres démontrent par ailleurs que les nitrates ont eux aussi été éliminés.

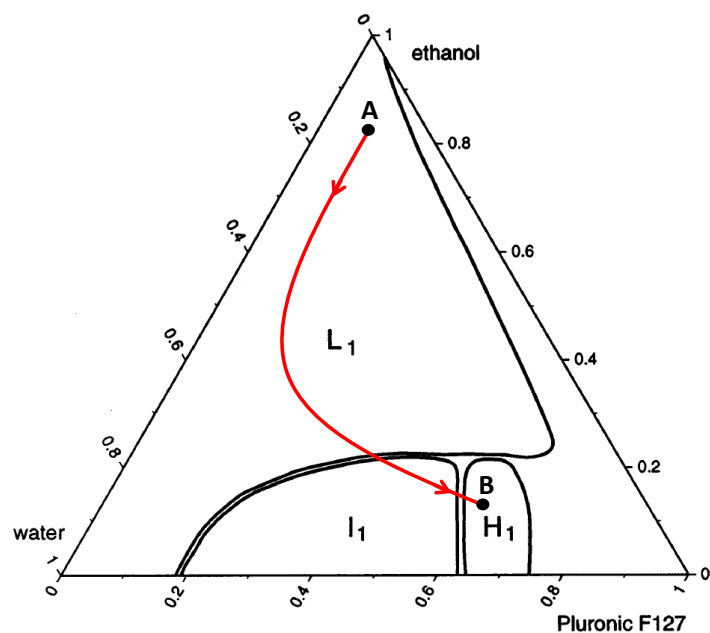


Figure 4-6 : Diagramme ternaire F127 / Eau / Ethanol. Domaine L_1 : solution isotrope homogène. Domaine H_1 : micelles cylindrique & réseau hexagonal. Domaine I_1 : micelles sphériques & réseau cubique.⁹³

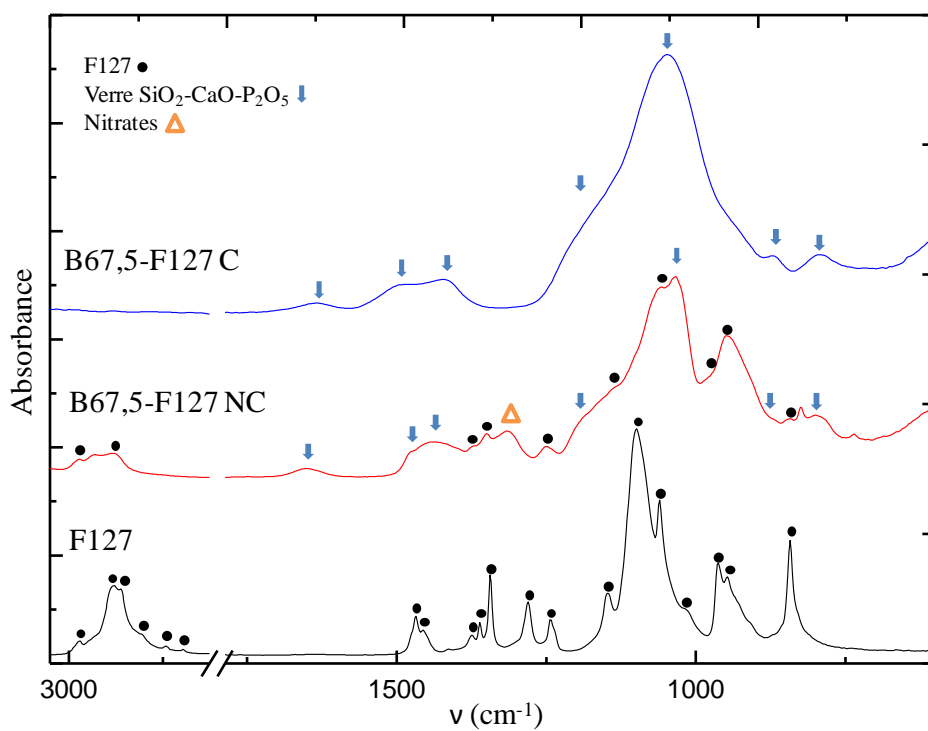


Figure 4-7 : Spectres Infrarouges du tensioactif F127, du verre B67,5-F127 avant (NC) et après (C) calcination.

4.2.2 Caractéristiques texturales des verres mésostructurés

La Figure 4-8 présente les images de Microscopie Electronique en Transmission (MET) des verres B75-F127 et B67,5-F127. Les deux verres forment après calcination des réseaux organisés de mésopores. La structure hexagonale observée est confirmée par la littérature⁹⁴ pour des synthèses similaires dans les mêmes domaines du diagramme ternaire. Les résultats de diffraction des rayons X à petits angles abondent en ce sens, car les pics relevés [100] et [110] (Figure 4-9) sont conformes à une symétrie hexagonale $P6mm$ de pores cylindriques. Ces pics, dont les positions sont relevées dans le Tableau 4-2, permettent de calculer les paramètres de maille via la loi de Bragg. Les distances inter-réticulaires [100] et [110] sont très proches pour les deux verres.

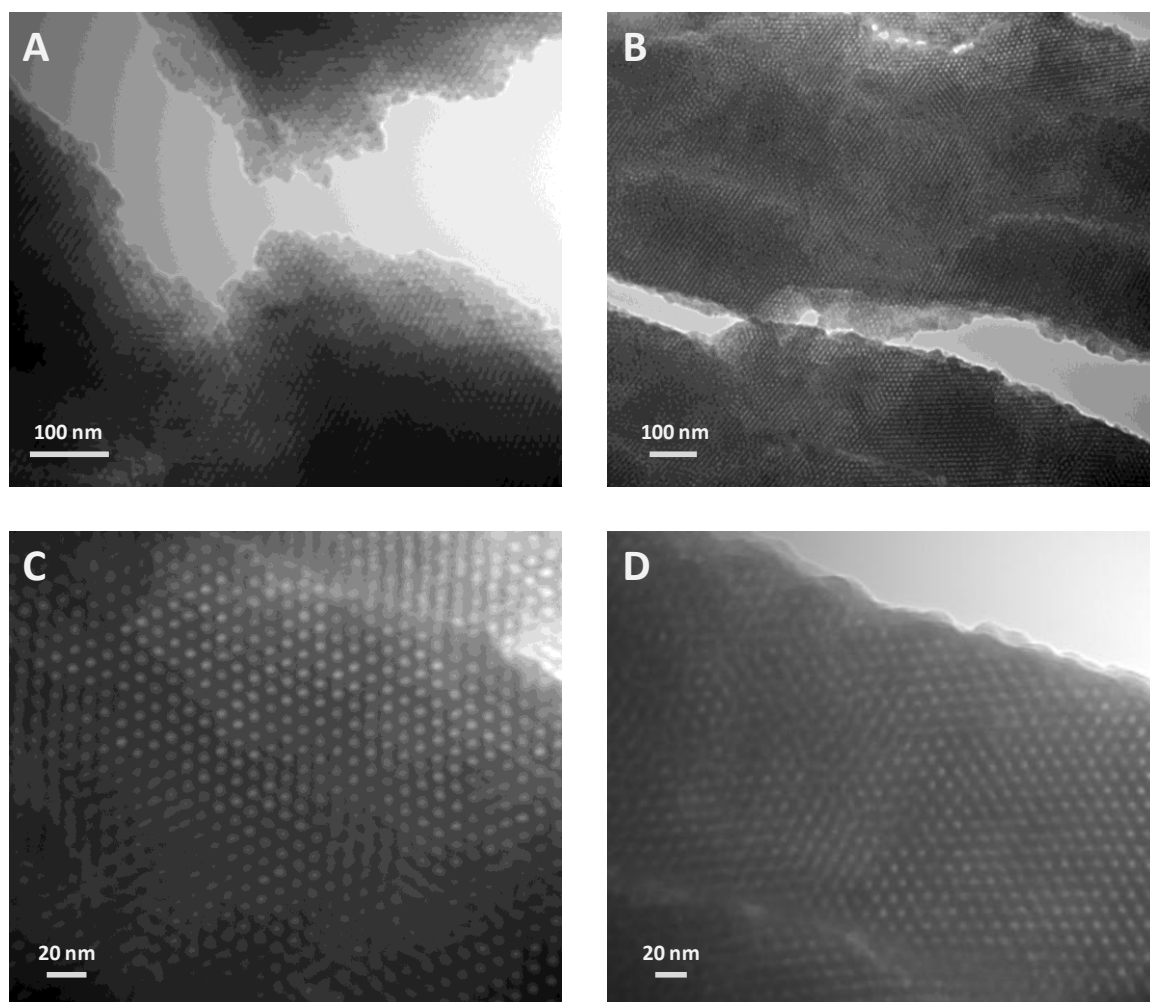


Figure 4-8 : Clichés MET de verres mésostructurés B75-F127 (A&C) et B67,5-F127 (B&D).

	DRX				MET	
	$2\theta_{100} (^{\circ})$	$2\theta_{110} (^{\circ})$	$d_{100} \text{ (nm)}$	$d_{110} \text{ (nm)}$	$d_{100} \text{ (nm)}$	$d_{110} \text{ (nm)}$
B75-F127	0,84	1,49	10	5,9	8,5	4,8
B67,5-F127	0,90	1,60	9,8	5,5	9,3	5,4

Tableau 4-2 : Distances inter-réticulaires estimées par DRX et MET - Verres B75-F127 et B67,5-F127.

Les distances estimées par des mesures moyennes sur des images MET, confirment un ordre de grandeur similaire. L'inversion des hiérarchies de tailles entre B75-F127 et B67,5-F127 peut éventuellement être imputée aux mesures MET qui sont par définition locales.

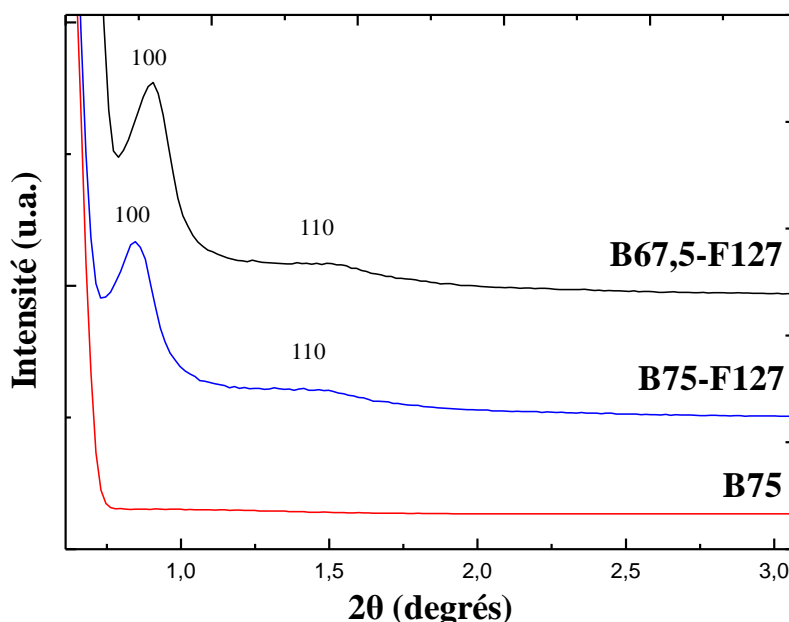


Figure 4-9 : Diffractogrammes aux petits angles d'un verre sol-gel 'conventionnel' B75 et de verres mésostructurés B75-F127 et B67,5-F127.

Intéressons nous à présent aux résultats obtenus par adsorption d'azote, présentés Figure 4-10. Les isothermes des deux verres, d'allure très similaire, sont de type IV, caractéristiques de verres mésoporeux. La distribution en taille montre un diamètre de pore très bien défini pour les verres binaires et ternaires mésostructurés. Cette homogénéité de taille nous est confirmée par des diamètres modaux et moyens très proches (Tableau 4-3), à l'inverse des verres B75 et B67,5 élaborés par synthèse conventionnelle. Les augmentations des surfaces spécifiques et des volumes poreux sont ainsi clairement dus à la mésoporosité induite par les tensioactifs.

	B75	B67,5	B75-F127	B67,5-F127
Surface spécifique (m ² /g)	30	112	442	410
Surface spécifique due à la microporosité (m ² /g)	0	8	80	38
Diamètre modal (nm)	4,6	8,9	4,3	3,9
Diamètre moyen (nm)	8,4	13,2	4,3	4,8
Volume poreux total (cm ³ /g)	0,062	0,289	0,444	0,49

Tableau 4-3 : Propriétés texturales des verres bioactifs mésostructurés B75-F127 et B67,5-F127.

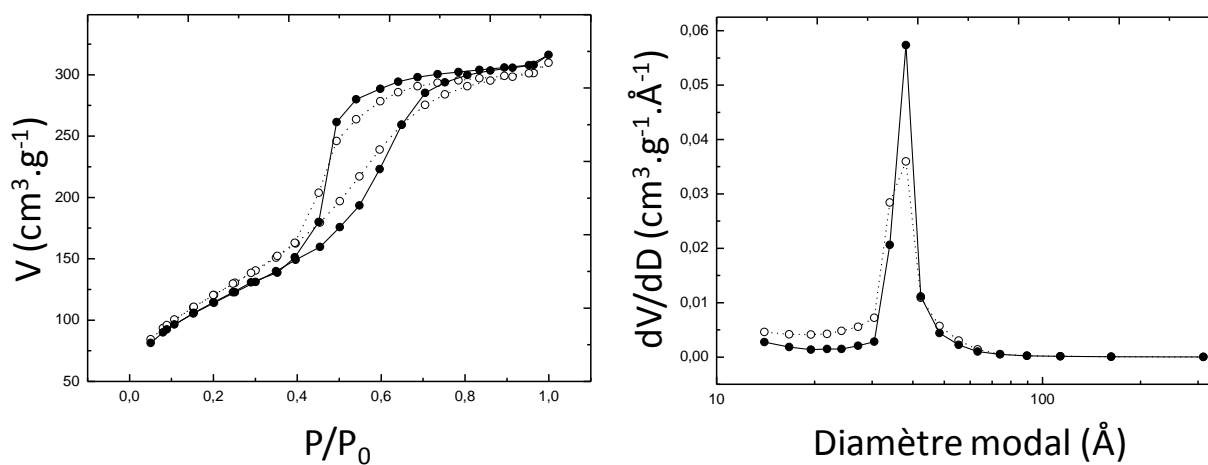


Figure 4-10 : Isothermes et distribution en taille de pore des verres bioactifs mésostructurés B75-F127 (○) et B67,5-F127 (●).

Chapitre 5 Verres macroporeux : du cristal de billes à l'opale inverse

La macroporosité joue un rôle de premier plan dans la biologie de l'intégration des substituts osseux (Partie 1). Plusieurs voies sont possibles pour obtenir des verres bioactifs macroporeux. On peut citer certains systèmes basés sur les mousses ou émulsions, qui sont entre autres, étudiés par Jones et al., dans leur application aux bioverres.^{95,96} Nous avons opté pour notre part, pour une méthode dites 'des opales inverses', grâce à l'emploi d'empreintes artificielles solides.

5.1 Macroporosité organisée

Le principe de la méthode choisie repose sur l'arrangement périodique de sphères monodisperses de polymère (polystyr ne⁹⁷, PMMA^{a,98}) ou de silice⁹⁹, dont les tailles sont variables (de la centaine de nanomètres à 2 microns). L'élaboration, conduisant à des structures macroporeuses calibrées et homogènes, se déroule en trois phases (Figure 5-1) :

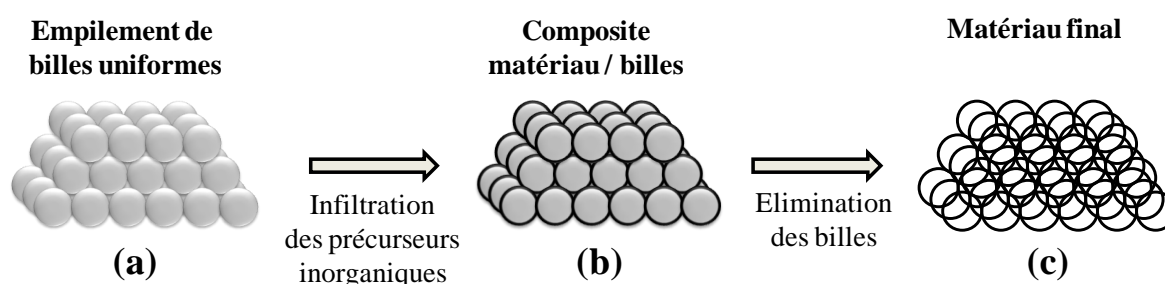


Figure 5-1 :  tapes de synthèse par la méthode des opales inverses.

^a Polyméthacrylate de méthyle.

5.1.1 Organisation du cristal de billes (a)

Un empilement de billes uniformes 3D est réalisé. Le terme ‘cristal’ se réfère à l’organisation des billes, similaire à celle des atomes d’un réseau cristallin formant une structure compacte. L’organisation conférée à ces billes peut être obtenue par différentes techniques. Quatre sont majoritairement décrites : sédimentation, centrifugation, filtration et évaporation.

- La *sédimentation*, basée sur la gravité est un processus très lent, nécessitant des semaines voire des mois.^{100,101} Elle est utilisée préférentiellement pour les billes de silice dont la densité est supérieure à celle des polymères organiques.

- Le principe de la *centrifugation* est proche de celui de la sédimentation ; la force centrifuge accélère cependant le processus de sédimentation et un empilement ordonné de billes peut être réalisée en quelques heures.

- La *filtration de suspensions* de billes permet elle aussi de former des cristaux colloïdaux. Les sphères se concentrent alors à la surface du filtre et s’agencent de manière à former un réseau compact.^{102,103}

- Enfin, la dernière technique est liée à l’*évaporation* du solvant^{104,105}. Les sphères s’organisent alors à la surface par ‘auto-assemblage convectif’. Ces dernières sont déposées sur un substrat plongé verticalement dans la suspension.

Grâce à des études réalisées précédemment au laboratoire¹⁰⁶ et pour des raisons tenant à la rapidité du processus et au volume de matériau final nécessaire aux interactions biologiques et à l’échantillonnage pour les études par faisceaux d’ions (0), la méthode par centrifugation s’est imposée.

5.1.2 Infiltration des précurseurs inorganiques (b)

L’imprégnation de l’opale par une solution permet d’infiltrer les précurseurs typiques du solide final dans l’espace interstitiel. La littérature révèle une grande variété de compositions et de microstructures associées aux opales inverses. La polymérisation d’espèces inorganiques a été privilégiée pour la réalisation de matrices SiO₂, TiO₂, V₂O₅, Al₂O₃, SnO₂, WO₃.^{102,100,97,107} La deuxième voie étudiées a été la précipitation de sels métalliques. Elle a permis d’élargir l’utilisation des opales à de nouveau oxydes (MgO, CrO₂,

Fe_2O_3)¹⁰⁸, à des carbonates¹⁰⁸ ou encore aux hydroxydes Double Lamellaires.^{109,110} Il faut noter que Stein et al. se sont déjà intéressés à des verres macroporeux à deux ou trois oxydes Si/Ca et Si/Ca/P.^{111, 112, 113, 114}

Différents paramètres, tels le temps d'infiltration ou la concentration des précurseurs influent sur la texture du matériau final. Nous reviendrons sur ces éléments dans le paragraphe suivant.

5.1.3 Elimination de l'empreinte sacrificielle (c)

L'opale est éliminée par dissolution via l'acide fluorhydrique pour les billes en silice et un solvant organique pour celles en polymère ou par calcination uniquement pour les polymères. Pour des causes évidentes liées à la proximité de nature entre les opales de silices et les verres que nous étudions, notre choix s'est porté sur des billes polymères et plus spécifiquement en polystyrène.

A l'issue de cette étape, l'organisation du cristal colloïdal est transférée au matériau inorganique final qui en est la réplique négative. Ainsi, cette méthode contrairement à d'autres, permet l'obtention d'un matériau à macroporosité calibrée et homogène.

5.2 Synthèse de verres bioactifs macroporeux

5.2.1 Caractérisation des billes

Pour former les opales, trois tailles de billes ont été choisies. Elles se présentent sous la forme de suspensions commerciales de sphères de polystyrène (10% massique) en solution dans l'eau (Duke Scientific Corporation). Leur diamètre ainsi que leur potentiel Zêta ont été mesurés (Malvern Zetasizer). Les résultats sont présentés dans le Tableau 5-1.

Diamètre de référence (nm)	Diamètre mesuré (nm)	Potentiel Zêta (mV)	Indice de polydispersité	Nomenclature		
				Sphères	Verre binaire	Verre ternaire
430	451	-46	0,027	S400	B75- 400	B67,5- 400
820	911	-52	0,037	S800	B75- 800	B67,5- 800
1500	1561	-40	0,081	S1500	B75- 1500	B67,5- 1500

Tableau 5-1 : Caractéristiques des billes de polystyrène utilisées.

On constate que le diamètre mesuré est légèrement supérieur à celui annoncé. Les billes sont cependant très monodisperses, leurs indices de polydispersité étant inférieurs à 0,1. Le diamètre des billes ne semble pas avoir d'effet important sur leur charge de surface. Celle-ci peut être attribuée aux groupements sulfonates greffés sur les billes de polystyrène pour permettre leur dispersion.

5.2.2 Formation du cristal

Les conditions optimales de centrifugation ont été déterminées précédemment.¹⁰⁶ Les solutions de billes de polystyrène à 0,5% massique dans l'eau (50 mL) sont centrifugées durant 14h à une vitesse de 1200 rotation par minutes, ce qui correspond à une force centrifuge relative (FCR) de 158. Il en résulte la formation d'un culot iridescent surmonté d'un surnageant translucide. Le surnageant est retiré et le culot séché à l'air durant 24h.

Les clichés de Microscopie Electronique à Balayage (MEB) réalisés sur des grains du cristal colloïdal (Figure 5-2), nous permettent de visualiser les arrangements. Les clichés à plus faible grossissement (A, D et G) nous montrent que l'organisation cristalline est présente à l'échelle du grain et pas uniquement sur des zones confinées. A plus fort grossissement (C, F et I), on remarque, malgré les défauts d'empilement (1D, 2D, zones non-organisées), que deux structures coexistent : Hexagonale (très majoritaire) et Cubique. La littérature décrit dans le cas de la sédimentation de sphères monodisperses, la présence de structures cubiques^{115,116} et Woodcock a montré via des simulations thermodynamiques qu'un réseau cubique était plus favorable énergétiquement qu'un réseau hexagonal.¹¹⁷ Au contraire, la centrifugation induit souvent des structures polycristallines, voire hexagonales, car la force exercée par une accélération de plusieurs g qui est imposée par la technique, perturbe une cristallisation seulement conduite par des effets thermodynamiques.¹¹⁸

Il faut noter qu'une fois séché, la cohésion du cristal est due uniquement aux forces de Van der Waals. Ceci explique que certaines études fassent état d'un renforcement mécanique par un traitement thermique, quelques degrés au-delà de la température de transition vitreuse.¹¹⁹

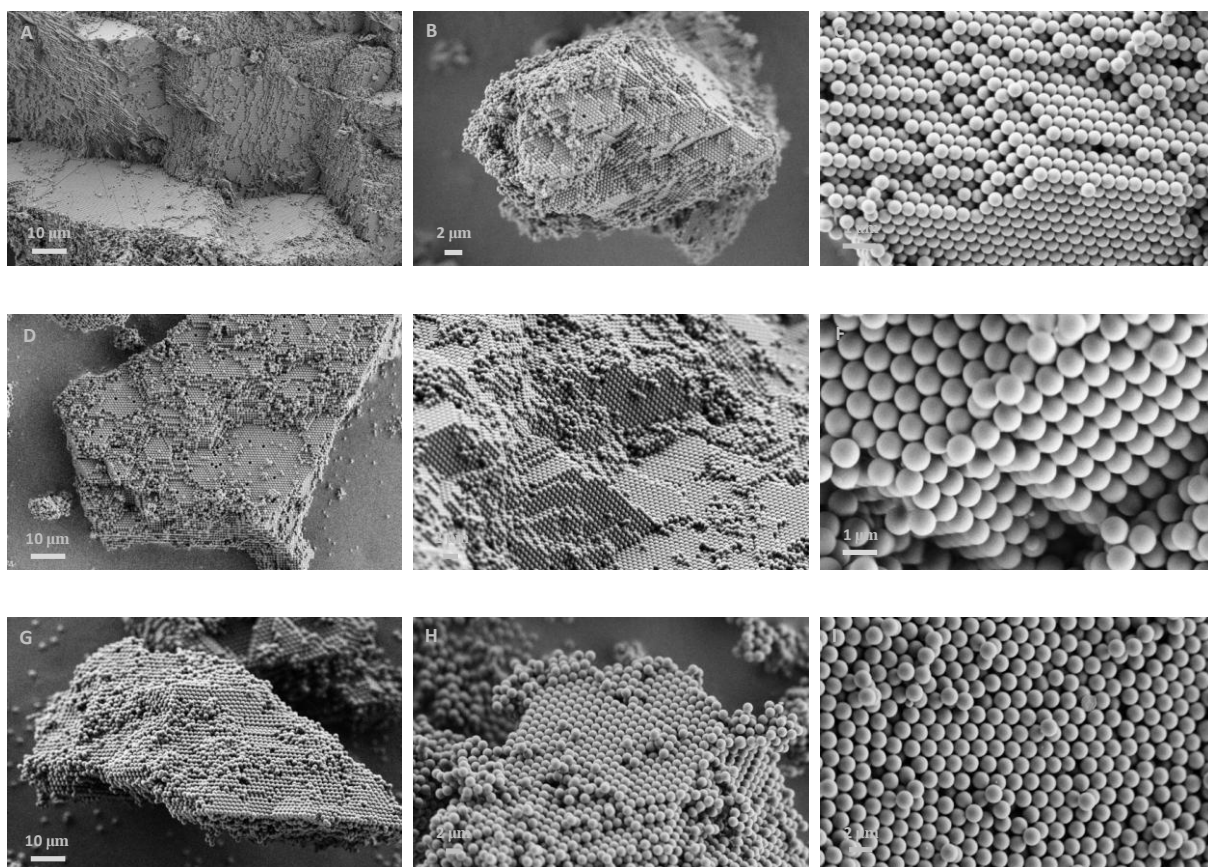


Figure 5-2 : Cliché MEB d'opales de billes S400 (A, B, C), S800 (D, E, F) et S1500 (G, H, I).

Nous n'avons pas opté pour cette voie, car l'opération extrêmement délicate peut induire une diminution drastique de la quantité de produit final, le volume disponible au sein du cristal étant réduit et moins accessible.¹⁰⁶ En conséquence, les cristaux ont subi de légères dissolutions lors de la phase d'infiltration, de par la présence d'espèces chargées en solution (H^+ , Ca^{2+} , ...). Plusieurs études ont en effet démontré leur influence sur une augmentation des forces répulsives (potentiel de Coulomb) au détriment de celles, attractives, de Van der Waals.¹²⁰

5.2.3 Elaboration d'un intermédiaire composite verre / polystyrène

L'étape d'imprégnation est réalisée en immergeant des pièces de cristal de billes de quelques millimètres de côté dans une solution de 10 mL contenant les précurseurs. Les sols utilisés sont ceux correspondant aux compositions B75 et B67,5 décrites précédemment (p 73) et préparés dans les mêmes conditions. Cependant, plusieurs tests concernant les concentrations et les temps d'imprégnations ont été réalisés pour un verre binaire avec des billes de 400 nm.

- Concernant la concentration, trois synthèses ont été tentées : i) conservation de la quantité d'éthanol par rapport au sol de référence (S1), ii) doubler le volume d'éthanol (S2), iii) le diviser par deux (S1/2). Dans le cas S2, la structure du solide final est 'écroulée' par rapport à celle de S1 (Figure 5-3). Holland et al.¹²¹ rapportent qu'une diminution de la concentration en précurseur induit une diminution de la quantité de solide se formant dans les interstices, ce qui se traduit par une fragilité du réseau qui ne peut pas se maintenir après l'élimination de l'empreinte. Par ailleurs, la concentration du précurseur (S1/2) ne permet pas de solidifier la structure, car la diminution de la quantité d'éthanol cause une démixtion de l'eau et du TEOS, empêchant l'homogénéité du sol. Nous avons donc privilégié la voie S1.

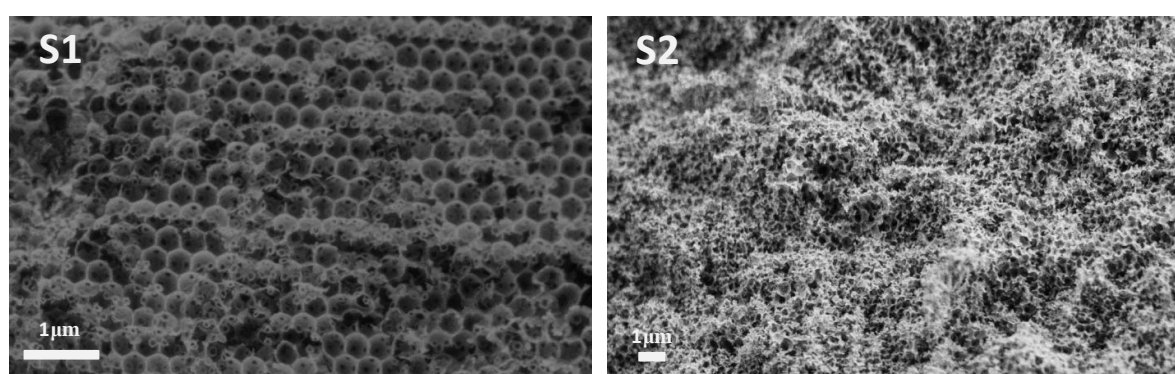


Figure 5-3 : Clichés MEB des matériaux issus des synthèses S1 et S2.

- Les synthèses S30m, S2h et S4h correspondent respectivement à des temps d'imprégnations de 30 min, 2h et 4h. Après 4h d'imprégnation, le cristal de billes est quasiment entièrement dissout : la voie S4h a donc été écartée. S30m mène à une structure comparable à celle de S2 (Figure 5-3). Une durée optimale d'imprégnation a donc été fixée à 2 heures.

A l'issue de l'imprégnation, la solution est filtrée sur Büchner pour éliminer l'excès de liquide. Le solide résiduel est alors transféré dans un récipient en Téflon fermé pour finaliser la formation du réseau inorganique (60°C, 24h). Un deuxième traitement thermique permet d'évaporer les solvants à 125°C (24h).

5.2.4 Calcination – Obtention du cristal final

La calcination est effectuée à 700°C durant 12h. Cette étape permet d'une part l'élimination de l'opale, et d'autre part celle des nitrates et la densification du matériau, de manière similaire aux verres mésostructurés et dopés. La Figure 5-4 présente les spectres infrarouges du cristal de bille de polystyrène et du verre B67,5-400 avant et après l'étape de

calcination. On remarque que les bandes typiques du polystyrène, disparaissent après la calcination. Il en est de même pour celles des groupements sulfates, provenant certainement de l'initiateur de la polymérisation des billes et pour celles des groupements nitrates, issus pour leur part, du précurseur de calcium. La masse résiduelle est comprise entre 6 et 8% pour les 6 verres, sans qu'il y ait de corrélation entre la perte de masse et la taille des billes ou la composition. Ce résultat est en accord avec la littérature (masse résiduelle comprise entre 3 et 14 %).¹²¹

Passons maintenant à la description des structures macroscopiques des répliques inorganiques. Ces structures étant similaires pour les verres binaires et ternaires, nous avons pris en exemple, les verres B75-400, B75-800 et B75-1500 (Figure 5-6). Ces derniers présentent des pores homogènes en diamètre, en forme et interconnectés. L'épaisseur des murs semble elle aussi constante. Cette macroporosité est organisée majoritairement en réseau hexagonal compact, en accord avec les empilements observés au sein du cristal de billes.

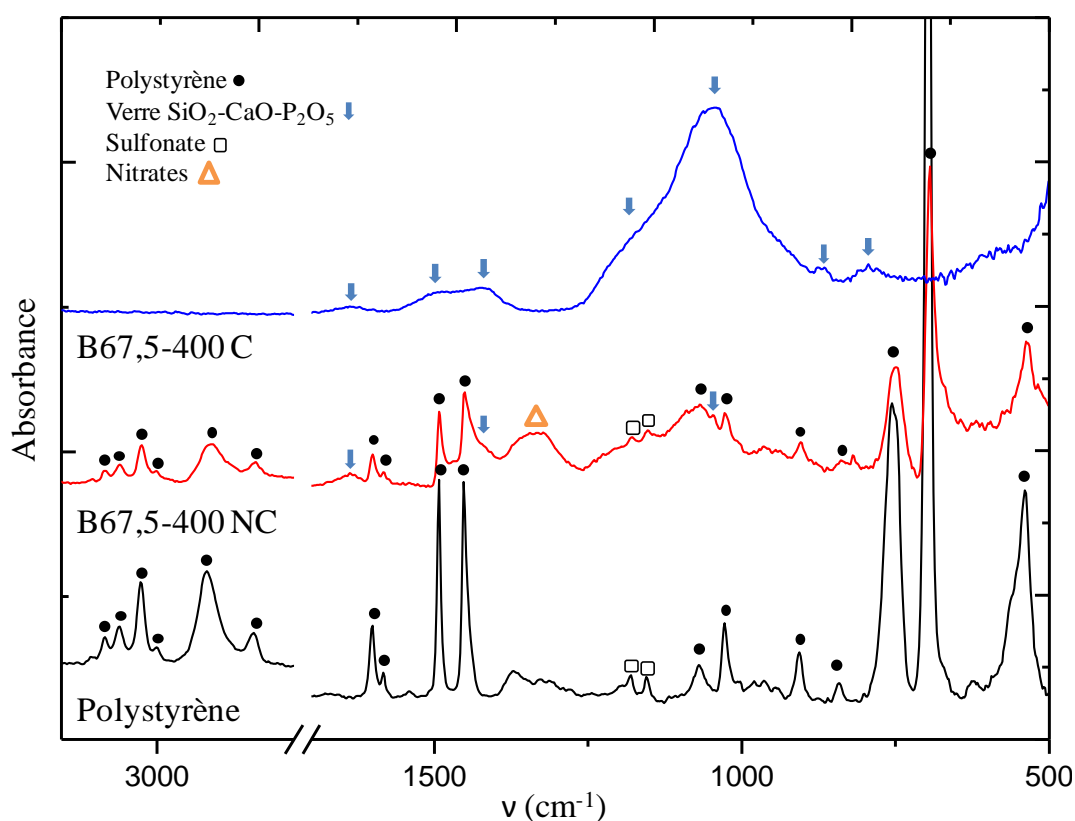


Figure 5-4 : Spectres Infrarouges du cristal de polystyrène, du verre B67,5-400 avant (NC) et après (C) calcination.

La taille des macropores a par ailleurs été évaluée par Thermoporosimétrie. Cette technique, développée au laboratoire^{122,123} est basée sur les propriétés qu'ont les liquides confinés de voir leur température de changement de phase notablement abaissée par rapport à l'état libre. Cet abaissement de température ΔT est caractérisé par DSC (Differential Scanning Calorimetry) et observable sur le thermogramme présenté sur la Figure 5-5. Il est relié à différents paramètres caractéristiques du système et notamment au rayon de courbure du liquide à l'interface, qui est assimilable au rayon du pore dans lequel le liquide est confiné. Ainsi dans notre cas, l'étude du ΔT de cristallisation lié au confinement de l'orthoxyène, a permis d'estimer la taille des macropores via une équation dérivée de Gibbs-Thomson¹²³ :

$$R_p = t \cdot \exp\left(\frac{-1}{c\Delta T}\right)$$

avec

R_p : rayon du pore.

$\Delta T = T_p - T_0$

T_p : température de cristallisation du solvant libre.

T_0 : température de cristallisation du solvant confiné.

t et c : constantes dépendant du solvant (pour l'orthoxyène, $t=1,814$ nm et $c=0,0384$ °C⁻¹)

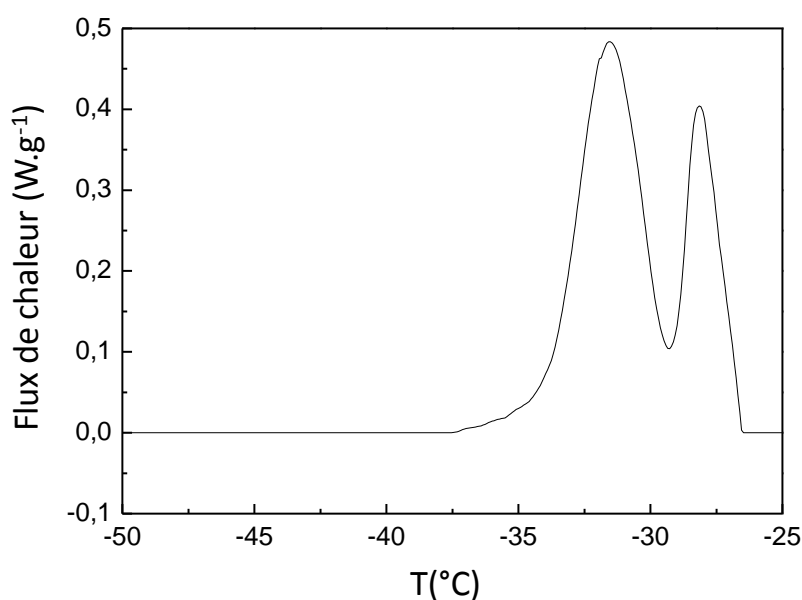


Figure 5-5 : Exemple du thermogramme de cristallisation de l'orthoxyène confiné dans le verre B400. Le premier pic à -28°C est dû au solvant en excès. Le second pic à -31°C représente l'orthoxyène confiné dans les pores du verre.

Les résultats sont donnés dans le Tableau 5-2. L'ordre croissant est respecté entre le diamètre des billes et celui des pores, que ce soit pour les verres binaires ou ternaires. On remarque cependant, que le pourcentage de retrait globalement autour de 30-35% n'est pas observé pour les verres B75-800 (54%) et B67,5-400 (14%). Pour comparaison, ce pourcentage se situe entre 26 et 34% dans le cas de silices macroporeuses.^{102, 121}

Diamètre des billes (nm)	Thermoporosimétrie				MET			
	Diamètres (nm)		% de retrait		Diamètres (nm)		% de retrait	
	B75	B67,5	B75	B67,5	B75	B67,5	B75	B67,5
451	287	387	36	14	341	364	23	19
911	416	577	54	36	629	719	31	21
1561	1079	943	30	39	1171	1053	24	32

Tableau 5-2 : Estimation du diamètre des macropores par thermoporosimétrie et microscopie électronique à transmission.

L'estimation des diamètres des macropores par Microscopie Electronique à transmission (Figure 5-7) et par Thermoporosimétrie (Tableau 5-2) confirment cette tendance au retrait. Cependant, les diamètres moyens observés par thermoporosimétrie sont supérieurs car les mesures réalisées sur les images MET sont locales et sur des coupes. Les clichés MET permettent également de confirmer l'organisation observées par MEB.

Les mesures de thermoporosimétrie nous ont également permis de caractériser le volume macroporeux total pour les 6 verres. Le volume V_p dans lequel a lieu la cristallisation du solvant a lieu, peut être obtenu en intégrant la distribution de taille des pores :

$$V_p(cm^3 / g) = \int \frac{dV_p}{dR_p} dR_p \quad \text{avec} \quad \frac{dV_p}{dR_p} \text{ distribution de tailles de pores} \quad (1)$$

La distribution de tailles de pores peut elle-même peut être calculée à partir du thermogramme, car

$$dV_p = k.Y. \frac{d(\Delta T)}{W_a} \quad (2)$$

avec

k : constante dépendant de la sensibilité de l'appareil et de la vitesse de refroidissement

Y : flux de chaleur, ou encore l'ordonnée du thermogramme obtenu par DSC

R_p : rayon des pores

W_a : énergie apparente de cristallisation du solvant confiné, qui tient compte de la diminution de l'enthalpie de cristallisation avec la diminution de la température et aussi de la fraction de solvant ne participant pas à la transition. W_a est alors exprimé :

$$W_a = 97.7 * \exp\left(\frac{\Delta T}{57.9}\right) \quad (3)$$

Le volume poreux peut donc se calculer en transformant la relation (2) :

$$\frac{dV_p}{dR_p} = \frac{0.03842.k.Y.\Delta T^2}{W_a.R_p} \quad (3)$$

Comme on peut le voir dans le Tableau 5-3, le volume macroporeux devient plus important lorsque le diamètre des macropores augmente, que ce soit pour les verres B75 ou les verres B67,5.

Diamètre des billes (nm)	Volume macroporeux (cm ³ .g ⁻¹)		Diamètre de l'interconnexion (nm)	
	B75	B67,5	B75	B67,5
451	1,40	4,47	55	90
911	2,37	7,01	177	170
1561	3,87	8,16	242	239

Tableau 5-3 : Volume total macroporeux calculé par thermoporosimétrie - Diamètres moyens des interconnexions des verres B75 et B67,5 macroporeux, mesurés sur les clichés MEB.

Le diamètre moyen des interconnexions a par ailleurs été calculé à partir des images MEB pour chaque verre. Il correspond au diamètre des fenêtres reliant les macropores. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 5-3. Il est clair que ce diamètre d'interconnexion augmente lorsque la taille des billes augmente.

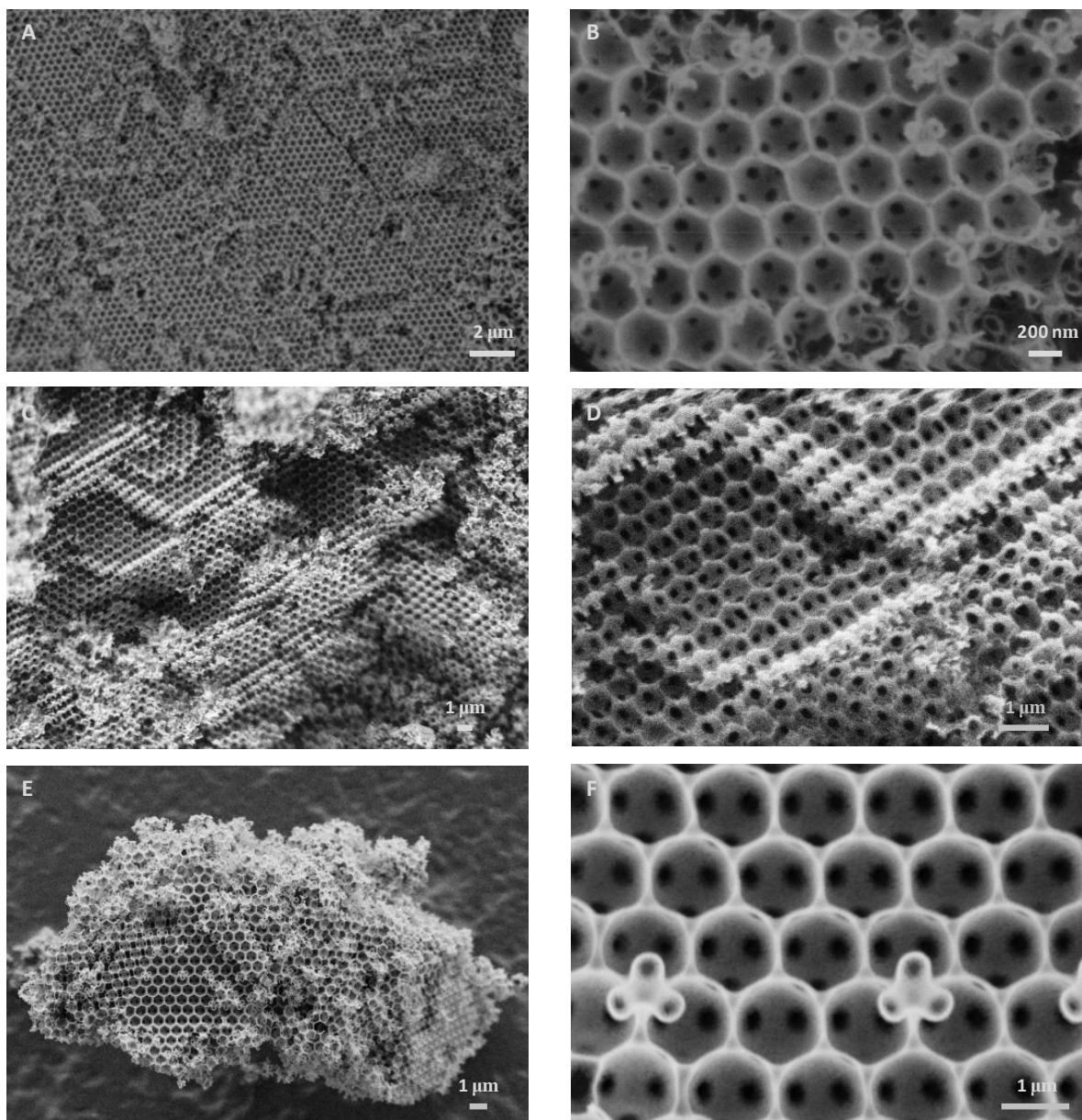


Figure 5-6 : Clichés MEB des verres macroporeux B75-400 (A&B), B75-800 (C&D) et B75-1500 (E&F).

Concernant la mésoporosité (Figure 5-8), elle est très faible pour les verres ternaires (petite hystérèse) et quasi-inexistante pour les verres binaires (pas d'hystérèse). La distribution de la mésoporosité, pour les verres ternaires, est très hétérogène et sans corrélation avec l'évolution de la macroporosité. L'allure de ces isothermes est par ailleurs très proche pour chaque type de verre (binaires et ternaires), quelle que soit la taille de la macroporosité. L'absence de plateau à l'équilibre $P/P_0=1$, confirme la présence de macroporosité.

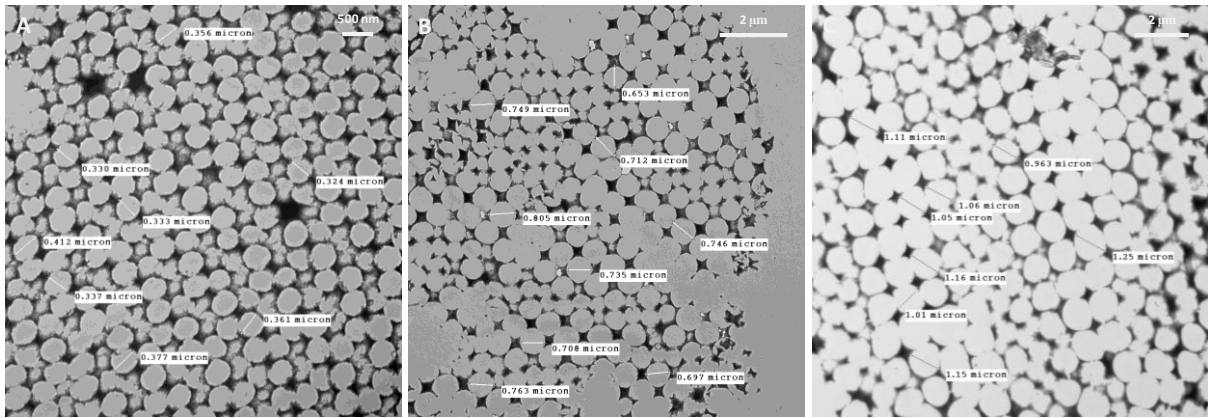


Figure 5-7 : Clichés MET des verres B67,5-400 (A), B67,5-800 (B) et B67,5-1500 (C).

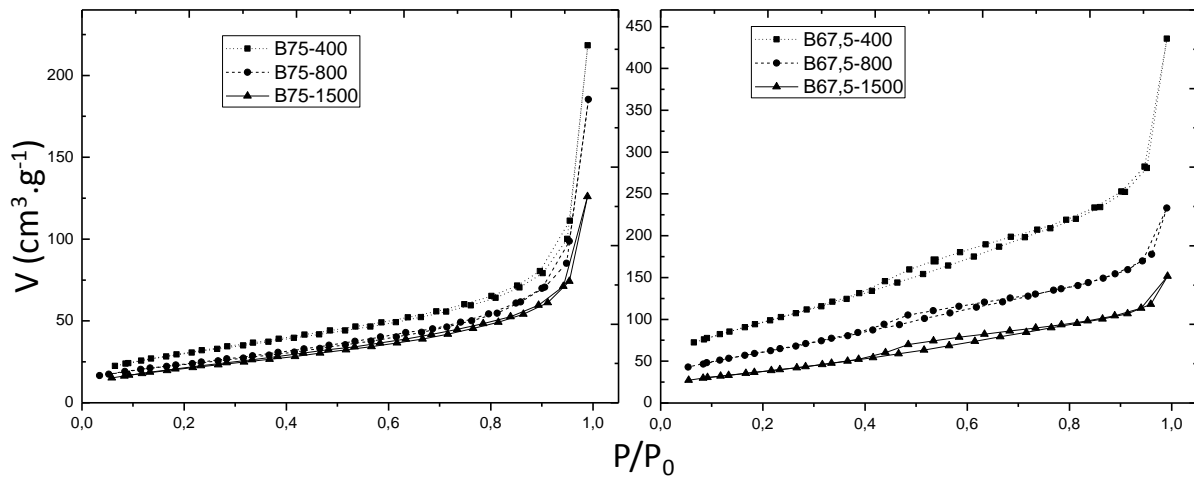


Figure 5-8 : Isothermes des verres bioactif macroporeux.

Les surfaces spécifiques (Tableau 5-4) évoluent de manière inversement proportionnelle au diamètre de la macroporosité. Si l'on considère que la porosité est uniquement macroscopique, sphérique et homogène, une corrélation géométrique peut être clairement établie (surface de la sphère $S = 4\pi R^2$).

	B75	B67,5	B75-400	B75-800	B75-1500	B67,5-400	B67,5-800	B67,5-1500
Surface spécifique (m²/g)	30	112	108	81	76	357	230	141
Volume poreux total (cm³/g)	0,062	0,289	0,338	0,286	0,198	0,701	0,375	0,235

Tableau 5-4 : Propriétés texturales des verres bioactifs macroporeux.

Partie 3 : Caractérisation des interactions physico-chimiques verre bioactif / milieu biologique

Chapitre 6 Etude typique : Méthodologie

6.1 Echantillonnage

6.1.1 Interactions des matériaux avec le milieu biologique

Comme nous l'avons vu précédemment, Kokubo⁴⁴ a été le premier à proposer d'évaluer la physico-chimie de la bioactivité dans un liquide simulant les fluides biologiques, le *Simulated Body Fluid* (SBF), dont la composition en ions minéraux est proche de celle du plasma sanguin. Il a ainsi démontré que le critère, permettant de prédire la bioactivité *in vivo* est la formation d'apatite à la surface de matériaux artificiels, lorsque ces derniers sont immergés dans ce milieu. Cette affirmation a cependant été remise en cause par Bohmer et al.⁴⁵, notamment car certains matériaux comme le sulfate de calcium dihydraté permettent la formation d'apatite *in vitro*¹²⁴, alors qu'ils se résorbent trop rapidement pour que ce soit le cas *in vivo*¹²⁵. Il existe malgré tout une forte corrélation *in vitro* / *in vivo* pour la majorité des matériaux et en particulier les verres bioactifs. Par ailleurs, la plupart des publications du domaine considère que ce premier test comme valable.

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma sanguin	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF original	142,0	5,0	1,5	2,5	148,0	4,2	1,0	0,0
DMEM	155,3	5,3	0,8	1,8	115,7	44,1	0,9	0,8

Tableau 6-1 : Concentrations ioniques moyennes du plasma sanguin humain, du SBF et du DMEM (mmol.L⁻¹).^{43, 126}

Pour notre étude, le DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) a été préféré au SBF. Il s'agit en effet d'un milieu de culture dont les concentrations en ions minéraux sont proches de celle du SBF (Tableau 6-1), mais qui contient par ailleurs des vitamines et acides aminés qui sont indispensables à la culture cellulaire (Tableau 6-2). Le DMEM a donc été utilisé dans un but de continuité entre les études physico-chimiques et les tests des réponses cellulaires. Le DMEM est par ailleurs un produit commercial, pour lequel les problèmes de préparation et notamment la stérilisation, ne se posent pas. Malgré une similitude des mécanismes des

interactions entre matériau et milieu biologique, deux différences sont observées par rapport au SBF : d'une part, une cinétique quelque peu ralentie durant les premières heures, et d'autre part, une épaisseur de couche d'apatite moindre.¹²⁷

Les interactions entre les verres et le DMEM correspondent à l'immersion des matériaux dans le liquide à une température de 37°C. Elles sont réalisées pour différents délais, afin de reconstruire ultérieurement des cinétiques de réaction. Ces délais ont été définis respectivement à 30 min, 1 h, 6 h, 12 h, 1 jour, 2 jours, 3 jours et 4 jours, pour les verres dopés, 15 min, 30 min, 1 h, 6 h, 12 h, 1 jour, 2 jours, pour les verres mésoporeux et enfin 15 min, 30 min, 1 h, 6 h, 12 h, pour les verres macroporeux.

Acides aminés	Concentration (mg/L)	Vitamines	Concentration (mg/L)
Glycine	30	Choline chloride	4
L-Arginine hydrochloride	84	D-Calcium pantothenate	4
L-Cystine 2HCl	63	Folic Acid	4
L-Glutamine	580	Niacinamide	4
L-Histidine hydrochloride	42	Pyridoxine hydrochloride	4
L-Isoleucine	105	Riboflavin	0,4
L-Leucine	105	Thiamine hydrochloride	4
L-Lysine hydrochloride	146	i-Inositol	7,2
L-Methionine	30		
L-Phenylalanine	66	Autres composants	Concentration (mg/L)
L-Serine	42	D-Glucose (Dextrose)	1000
L-Threonine	95	Phenol Red	15
L-Tryptophan	16	Sodium Pyruvate	110
L-Tyrosine	72		
L-Valine	94		

Tableau 6-2 : Constituants complémentaires du DMEM.

Par ailleurs, pour les verres dopés, le rapport (surface spécifique du matériau)/(volume de DMEM) a été maintenu constant et fixé à 500 cm⁻¹ pour 10 mg de poudre, afin d'évaluer l'impact sur la bioactivité de la composition chimique du verre et non de sa surface de contact avec le milieu biologique. Au contraire, pour les verres mésostructurés et macrostructurés, le rapport gardé constant est un rapport (masse du matériau)/(volume de DMEM), puisque le but est d'étudier l'influence des propriétés texturales. Ce rapport a été fixé à 3,3 g.L⁻¹ pour les

verres binaires et $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ pour les verres ternaires, afin de comparer aux verres sol-gel conventionnels. Après chaque interaction, la composition chimique du DMEM a été analysée par ICP-AES, pour connaître les évolutions des concentrations des éléments majeurs et traces, et les corrélérer ainsi aux mesures PIXE.

6.1.2 De la poudre à la cible

La Figure 6-1 est une simulation extraite de la thèse de J. Lao¹⁵⁶, réalisée grâce au logiciel SRIM (the Stopping and Range of Ions in Matter) et représentant le parcours d'un faisceau de protons dans différents matériaux en fonction de l'énergie d'accélération. Cette simulation indique que le faisceau de protons utilisé en PIXE permet de sonder les verres étudiés jusqu'à une profondeur de plusieurs dizaines de microns. Il est donc nécessaire de réaliser des coupes transverses fines de nos matériaux pour analyser les phénomènes apparaissant en surface des verres bioactifs, tel le développement de couches phosphocalciques localisées dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques microns. Si l'on considère plus particulièrement les verres macroporeux, l'observation de réactions à l'échelle des pores impose une épaisseur de coupe inférieure ou égale au diamètre de ces derniers. Sur ces considérations, deux épaisseurs de coupe ont été choisies : $1 \mu\text{m}$ pour les verres dopés et mésoporeux, et 400 nm pour les verres macroporeux.

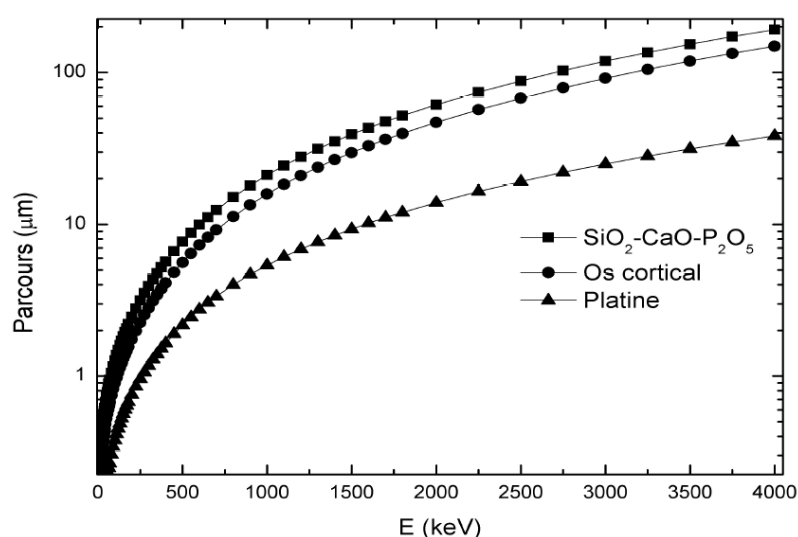


Figure 6-1 : Evolution du parcours moyen R d'un faisceau de protons dans différents matériaux en fonction de l'énergie des particules.¹⁵⁶

Le protocole de préparation des cibles a été le suivant : après interaction avec le DMEM, les poudres sont séchées sous atmosphère ambiante, puis incluses en résine (Figure 6-2/A). Les coupes, dont l'épaisseur dépend de l'échantillon sont alors réalisées (Figure 6-2/B) à l'aide d'un Ultramicrotome Leica EM UC6, grâce à un couteau 'Histo' en diamant (45°) incliné de 6° par rapport au plan horizontal et à une vitesse de 1,4 mm/s. Les meilleures coupes contenant les sections de grains (Figure 6-2/C) sont placées dans une grille double en cuivre 50 mesh. Ces dernières sont collées sur des supports en Mylar percés en leur centre d'un trou de 3 mm de diamètre et eux-mêmes fixés sur des disques en aluminium. Les échantillons sont alors prêts à être analysés par faisceau d'ions.

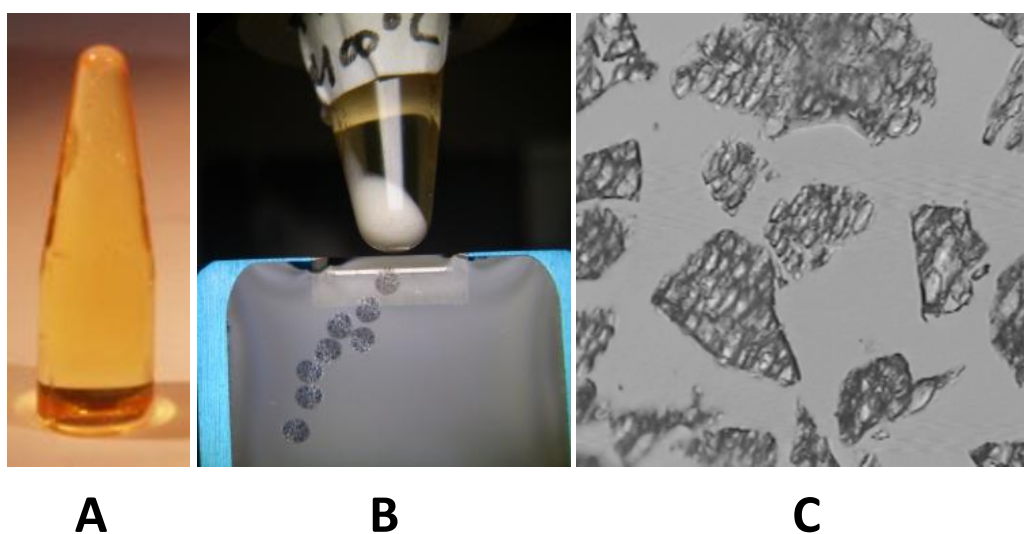


Figure 6-2 : A-Poudre incluse en résine. B-Découpe de cibles ultrafines à l'ultramicrotome. C-Image par microscopie optique d'une coupe contenant des grains de verre bioactifs (microscope optique).

6.2 Exploitation des données micro-PIXE et RBS

Ces quelques lignes ont pour but d'explicitier brièvement la démarche de traitement des données obtenues par micro-PIXE des résultats de PIXE (Figure 6-3), le principe de la microsonde, la description du dispositif expérimental et l'application concrète de ces techniques à notre étude étant présentés en annexe de ce document.

Les acquisitions sont toujours réalisées à l'échelle d'un grain de verre. La première étape consiste donc à générer des cartographies, grâce au logiciel *SupaVisio*. Pour une cartographie donnée, à chaque pixel est attribuée l'intensité d'un pic correspondant à un élément (Si,

Ca...). En considérant plusieurs cartographies, pour un même grain, il est possible de dégager plusieurs zones d'intérêt. Le même logiciel *SupaVisio* permet d'enregistrer les spectres PIXE et RBS de chaque zone. L'analyse de ces spectres *via* les codes *SimNRA* et *Gupix*, permet de remonter à des concentrations élémentaires. Ainsi pour un délai d'interaction, chaque concentration est une moyenne de 6 à 10 zones d'intérêt similaires. Cette moyenne pour chaque délai est alors utilisée comme 'brique' pour construire une cinétique des processus physico-chimiques.

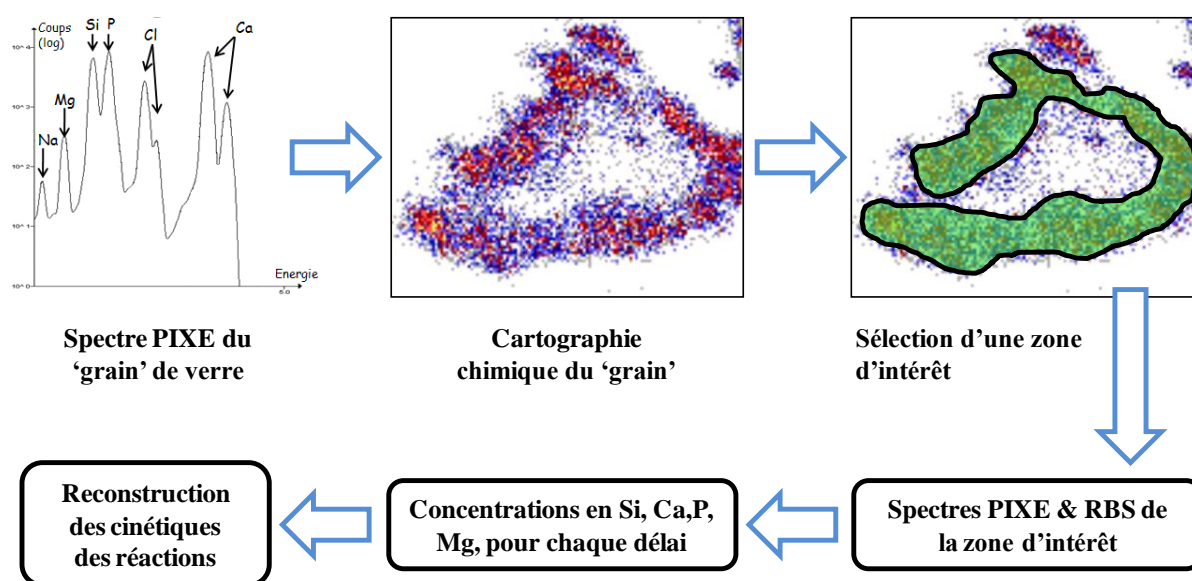


Figure 6-3 : Méthodologie d'exploitation des données PIXE et RBS.

Un point important concerne l'incertitude associée à chaque point. Comme est précisé en annexe, l'erreur sur le calcul de chaque concentration dépend de plusieurs paramètres, mais elle reste relativement faible. Au contraire, l'incertitude liée à la statistique, c'est-à-dire aux différences de concentrations intrinsèques aux zones analysées, est plus importante. C'est donc cette incertitude qui sera associée à chaque point via un écart-type empirique de la forme :

$$S_n = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

Avec

X_i : Concentration dans chaque zone.

\bar{X} : Concentration moyenne.

n : Nombre de zones

Pour une meilleure lecture des graphes et notamment lors de la comparaison des cinétiques de plusieurs verres, les barres d'erreur associées à ces écarts-types ne seront pas affichées. Les écarts-types maximum exprimés sous formes de pourcentages sont néanmoins présentés pour chaque type de verre dans le Tableau 6-3.

	B67,5-Zn	B75-Mg	B67,5-Mg	B75-F127	B67,5-F127	B75 macroporeux	B75 macroporeux
Si	2,3	2,4	12,2	0,9	4,3	3,4	3,9
Ca	7,7	24,8	10,3	15,5	2,2	20,1	10,0
P	6,0	32,1	4,2	6,2	1,7	19,3	4,9
Zn	11,7	—	—	—	—	—	—
Mg	—	38,7	16,4	—	—	—	—

Tableau 6-3 : Maxima des écarts-types exprimés en pourcentage, pour chaque verre étudié par faisceaux d'ions.

Chapitre 7 Verres binaires et ternaires dopés en magnésium

Dans cette partie concernant les verres dopés au magnésium, ainsi que pour les parties consacrées au dopage en zinc ou à la mésoporosité, les résultats (cartographies chimiques, évolutions des concentrations dans les matériaux et dans le milieu...) sont comparés aux verres de référence B75 et B67.5 déjà étudiés par PIXE-RBS au sein de l'équipe.¹²⁸

7.1 Cartographies chimiques

Les cartographies présentées correspondent aux distributions des intensités des rayonnements X émis localement sous l'irradiation des protons. Plusieurs mesures ont été enregistrées pour chaque délai d'immersion dans le DMEM. Cependant, seules sont présentées ici, les cartographies des délais pour lesquels des changements de distributions élémentaires sont significatifs.

7.1.1 Verres binaires

Les comportements des verres binaires ($\text{SiO}_2\text{-CaO}$) dopés avec 1% et 5% d'oxyde de magnésium sont similaires mais diffèrent clairement du verre non dopé. Comme nous le montre la Figure 7-1, les grains de B75 sont homogènes dans la répartition des éléments silicium et calcium avant immersion dans le DMEM. Il en est de même pour les éléments silicium, calcium et magnésium du verre B75-Mg1.

Pour les verres dopés, après 30 minutes d'immersion, le phosphore provenant du milieu est intégré à la surface du grain, mais les distributions en calcium et phosphore ne semblent pas modifiées. Les premiers précipités de phosphate de calcium apparaissent à la périphérie du grain après 6h et sont concomitants avec une perte de calcium au cœur du grain. Ces précipités semblent plus riches en magnésium que la matrice initiale. Dans le même temps, la couche Ca-P du verre non dopé (formée après 1h) commence à se dissoudre. Pour les délais de 1 à 2 jours (Figure 7-2), une couche Ca-P contenant préférentiellement le magnésium est

clairement distincte du cœur de silice pour les verres dopés. Cette couche se dissout lentement après 3 jours, mais persiste au bout de 4 jours (Figure 7-3), alors qu'elle a totalement disparu pour le verre non-dopé, qui conserve uniquement son réseau de silice.

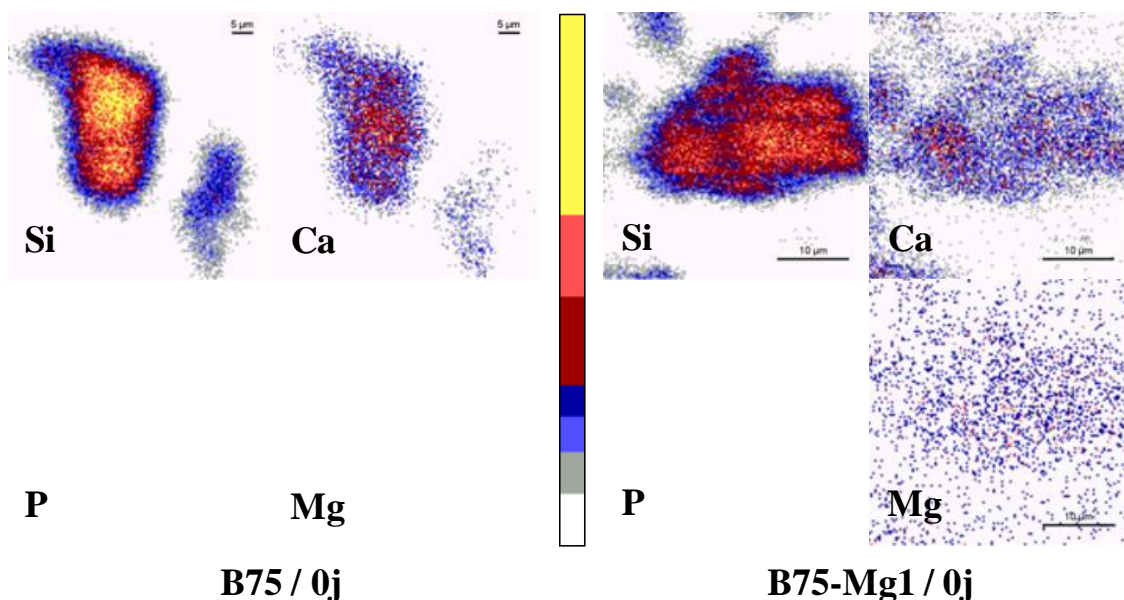


Figure 7-1 : Distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans des grains de verres B75 et B75-Mg1, avant interaction avec le milieu biologique.

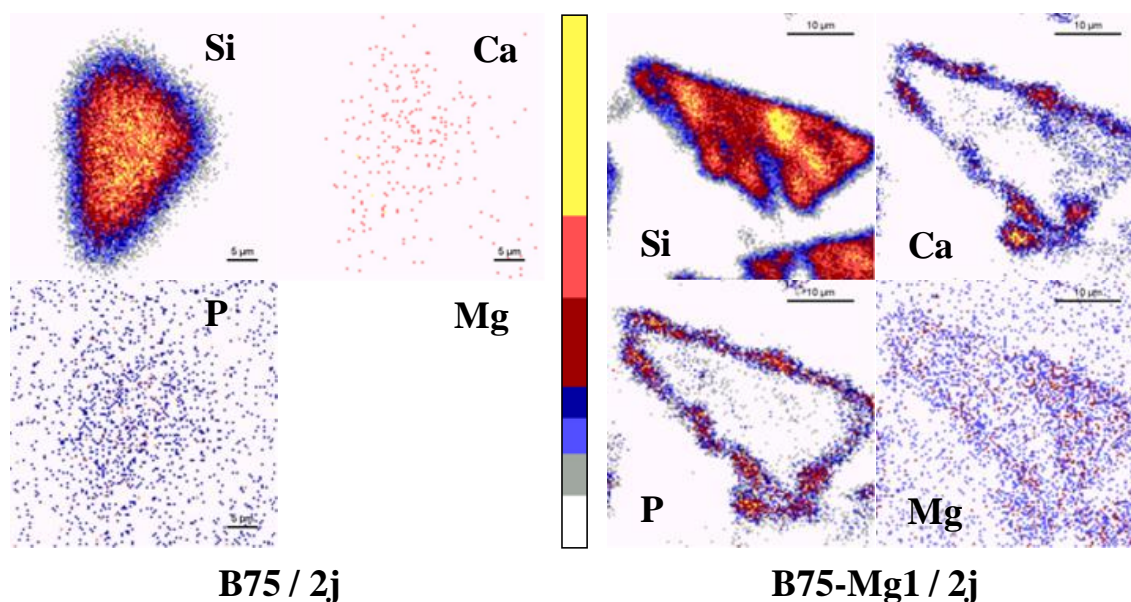


Figure 7-2 : Distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans des grains de verres B75 et B75-Mg1, après 2 jours d'interaction avec le milieu biologique.

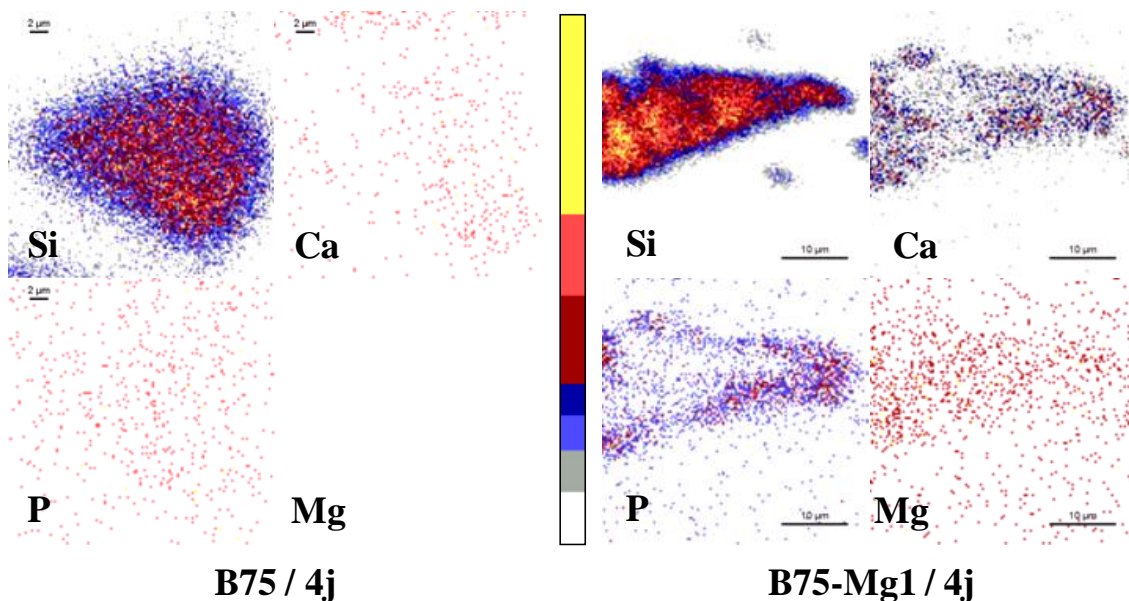


Figure 7-3 : Distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans des grains de verres B75 et B75-Mg1, après 4 jours d'interaction avec le milieu biologique.

7.1.2 Verres ternaires

Contrairement à ce qui est observé pour les verres binaires, les cartographies ne nous permettent pas de différencier de prime abord les comportements des trois matériaux, qu'ils soient dopés en magnésium, ou non dopés. Les grains sont homogènes en composition avant immersion dans le DMEM (Figure 7-4). Après 12h d'immersion, une couche riche en calcium, phosphore et magnésium est clairement distincte de la zone interne riche en silicium, et ce pour les trois verres. Cette couche croît progressivement de la périphérie au centre du grain entre 12h et 3 jours (Figure 7-5). Finalement, toujours dans les trois cas, les grains sont totalement transformés en phosphate de calcium après trois jours d'immersion (Figure 7-6). Leur concentration en silicium semble alors très faible.

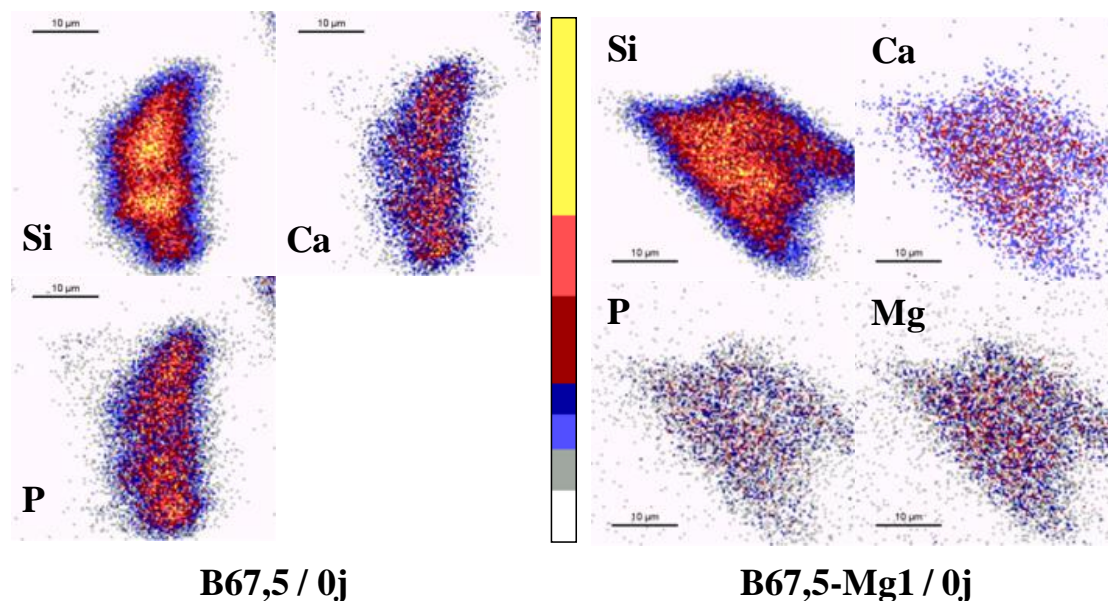


Figure 7-4 : Distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans des grains de verres B67,5 et B67,5-Mg1, avant interaction avec le milieu biologique.

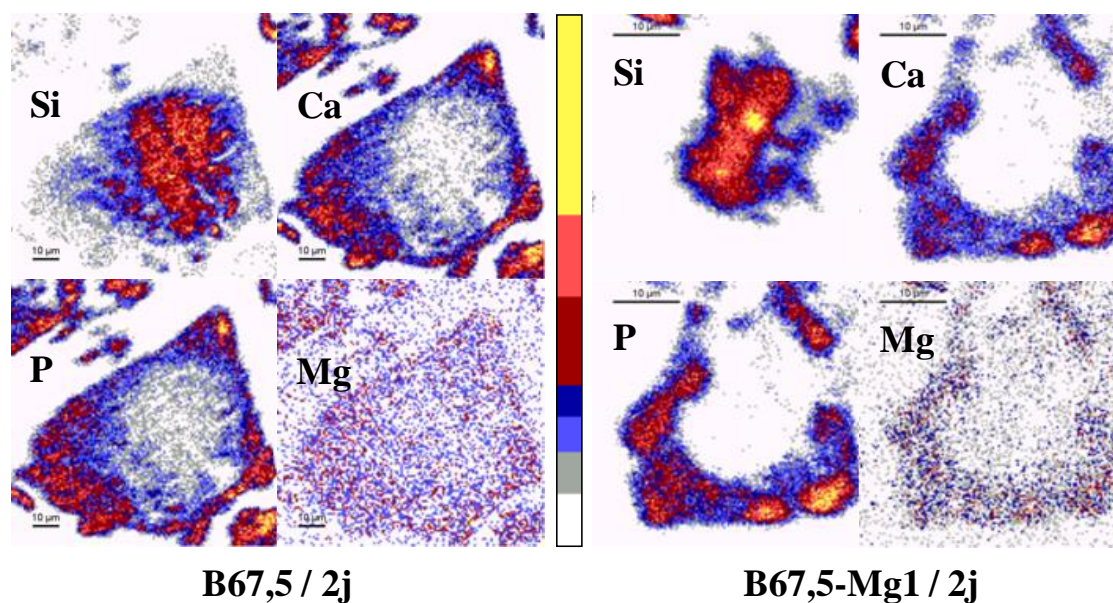


Figure 7-5 : Distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans des grains de verres B67,5 et B67,5-Mg1, après 2 jours d'interaction avec le milieu biologique.

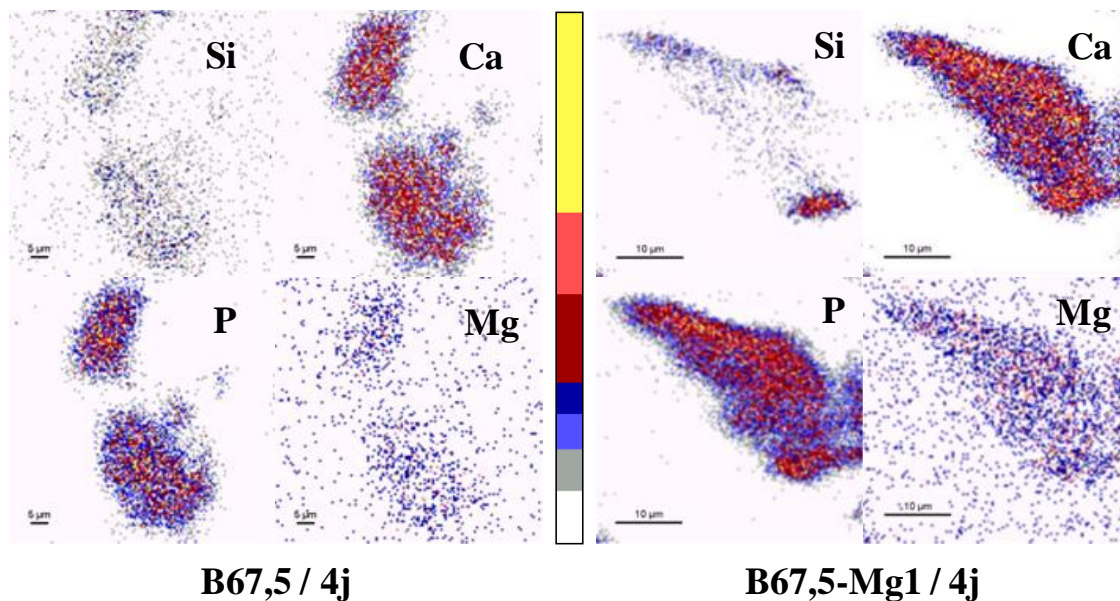


Figure 7-6 : Distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et magnésium dans des grains de verres B67,5 et B67,5-Mg1, après 4 jours d'interaction avec le milieu biologique.

7.2 Evolution des concentrations élémentaires au sein des matériaux

Les cartographies élémentaires indiquent de manière nette que l'évolution de la répartition des éléments est discriminée en deux régions d'intérêts : périphérie et cœur du grain. Les concentrations ont donc été calculées distinctement pour ces deux zones.

7.2.1 Zone périphérique des grains

Verres binaires (Figure 7-7)

Pour les trois échantillons, une diminution de la concentration en silicium est observée, avec un minimum atteint après 6 heures pour les verres B75 et B75-Mg1, et 12 heures pour le verre B75-Mg5. Cette diminution est accompagnée par une augmentation de la concentration du calcium, qui peut être attribuée à une incorporation des ions Ca^{2+} du milieu à la périphérie du grain pour former une couche amorphe Ca-P. Cette supposition semble être valide, car dans le même temps, le pourcentage de phosphore croît régulièrement. Un plateau est alors observé dans le cas des verres dopés pour les concentrations en silicium (entre 13 et 15%), calcium (entre 27 et 33%) et phosphore (autour de 7%). Ce plateau est localisé entre 12 heures et 2 jours pour le verre B75-Mg1 et entre 12 heures et 3 jours pour le verre B75-Mg5.

Il précède une diminution des pourcentages de Ca et P concomitante avec une augmentation de la concentration en silicium. Il est à noter que ce plateau est plus long pour le verre dopé 5%, retardant ainsi l'évolution finale. Dans le cas du verre non dopé, un plateau ou du moins un maximum pour le calcium et le phosphore, est présent pour un seul délai (6 heures), après quoi les concentrations retombent à des valeurs relativement basses (6% pour Ca et 0,2% pour P). Il est raisonnable de penser que la longueur du plateau décrit précédemment est représentative de la 'durée de vie' de la couche Ca-P. Cette durée de vie semble s'allonger lorsque le dopage en magnésium augmente.

L'évolution du magnésium suit quant-à-elle deux voies distinctes : dans un premier temps, sa concentration diminue pour le verre B75-Mg5 et elle augmente pour les verres B75-Mg1 et B75, pour atteindre dans les deux cas une valeur proche de 1% (6h pour B75 et 12h pour les autres). Les concentrations évoluent alors lentement pour atteindre lentement des valeurs plus importantes pour le verre B75-Mg5 et plus faibles pour les verres B75-Mg1 et B75 (jusqu'à atteindre zéro pour B75).

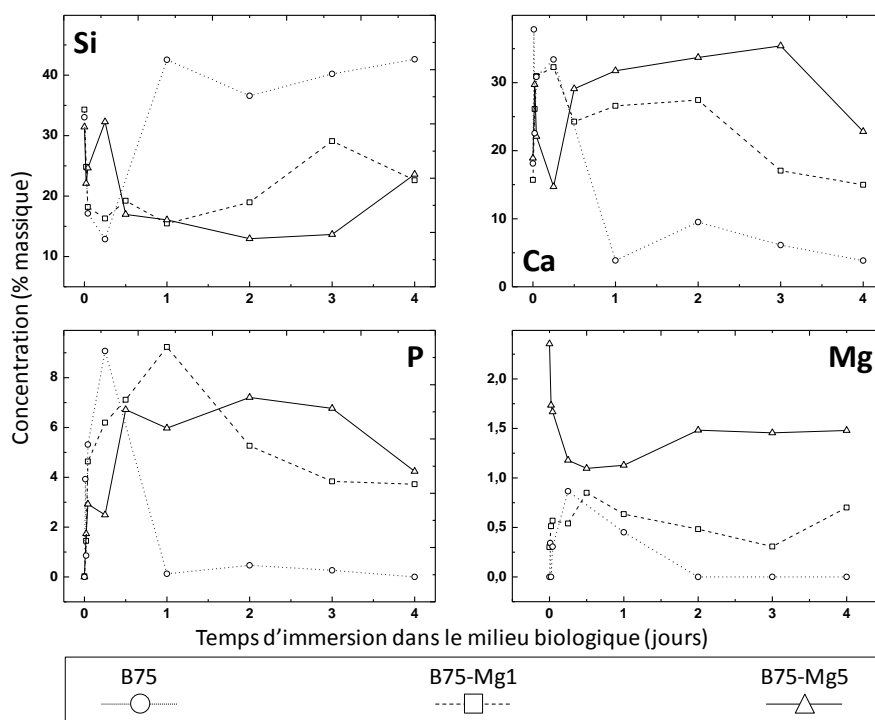


Figure 7-7 : Evolution des concentrations en silicium, calcium, phosphore et magnésium à la périphérie de grains de verre B75, B75-Mg1 et B75-Mg5.

Verres ternaires (Figure 7-8)

Les évolutions des concentrations périphériques sont plus simples à décrire pour les verres ternaires que pour les verres binaires. En effet pour les trois matériaux, lors d'une première étape très rapide, la concentration en calcium diminue et celle en silicium augmente, ce qui correspond à une désalcalinisation du réseau. Ensuite lors de la deuxième étape, le pourcentage de silicium décroît pour atteindre une valeur proche de zéro. Parallèlement, les pourcentages de calcium et de phosphore augmentent jusqu'à atteindre un plateau (autour de 38% pour Ca et de 17% pour P). La concentration en magnésium évolue de la même manière que pour les verres binaires : augmentation pour les verres non dopés et diminution pour ceux dopés avec 5%. Cependant, seules deux courbes semblent évoluer vers une valeur proche de 1% (après 12 heures). Les concentrations en magnésium en périphérie des trois verres convergent autour de 0,5% à 4 jours d'interaction.

Ces observations suggèrent que la périphérie de ces matériaux est enrichie en calcium, phosphore et magnésium pour former une couche. Cette dernière est relativement stable pour les verres ternaires contrairement à leurs homologues binaires.

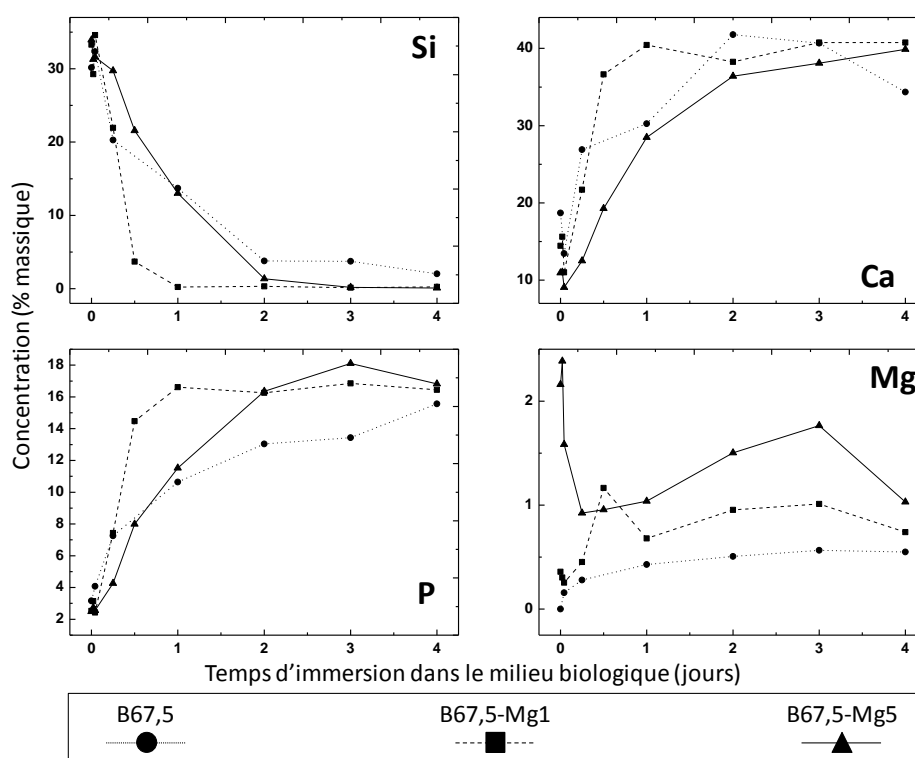


Figure 7-8 : Evolution des concentrations en silicium, calcium, phosphore et magnésium à la périphérie de grains de verre B67,5 ; B67,5-Mg1 et B67,5-Mg5.

7.2.2 Cœur des grains

Verres binaires (Figure 7-9)

Pour la série des verres binaires, les mécanismes de diffusion et de migration des ions vers la périphérie du matériau, conduisent à des fluctuations dans la composition de la matrice vitreuse. Il est cependant notable que les pourcentages de calcium et de magnésium diminuent car les ions alcalino-terreux migrent vers l'extérieur du grain. De manière logique, la concentration en silicium augmente au cœur du grain, car le silicium et le calcium représentent plus de 95% de la matrice. De fait, une variation de concentration d'un de ces deux oxydes entraîne l'effet opposé pour le deuxième. Le phosphore qui s'était initialement intégré au cœur du matériau voit sa concentration diminuer à mesure qu'il est relargué et intégré dans la couche phosphocalcique. Enfin la concentration en magnésium tend vers une valeur proche de 0,5%.

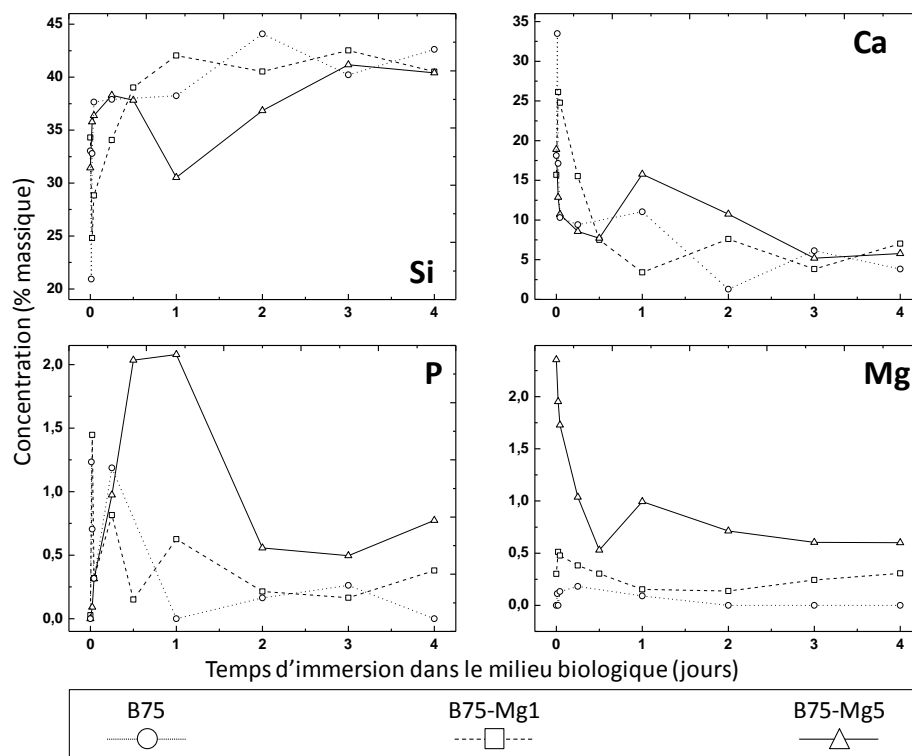


Figure 7-9 : Evolution des concentrations en silicium, calcium, phosphore et magnésium dans la région intérieure des grains de verre B75, B75-Mg1 et B75-Mg5.

Verres ternaires (Figure 7-10)

Le comportement des verres ternaires dopés est très similaire à celui des verres binaires au début du processus. En effet, après 6 heures d'interaction pour B67,5-Mg1 (2 jours pour B65,5-Mg), la concentration en calcium diminue, et celle de Si évolue dans le sens opposé. Lors de cette première étape chronologique, le pourcentage de phosphore décroît et celui de magnésium se stabilise autour de 0,5%, comme cela avait été observé pour les verres binaires. Dans un deuxième temps, les concentrations en phosphore et calcium augmentent significativement (respectivement jusqu'à 40% et 17%). La quantité de silicium, après avoir décru lors de cette même étape atteint une valeur proche de zéro après 3 jours pour les deux verres dopés. Ces résultats confirment la tendance observée grâce aux cartographies élémentaires, c'est à dire la croissance vers le centre du grain de la phase constituant la couche initiale. Pour les verres ternaires dopés, la concentration du cœur en magnésium semble tendre vers une valeur commune, qui se situe autour de 1% après 4 jours, ce qui était aussi le cas en périphérie. Un des points les plus importants concernant les verres dopés, est la cinétique plus lente pour le verre B67,5-Mg5 comparée à celle de B67,5-Mg1.

L'évolution du verre non dopé diffère un peu des deux autres matériaux. En effet, malgré une diminution globale de la concentration du silicium, accompagnée d'une augmentation de celles du calcium et du phosphore, les concentrations finales (14% de Si, 27% de Ca et 12% de P) demeurent éloignées des valeurs des verres dopés. Cela traduit une persistance du réseau de silice pour le verre non dopé, bien que le grain final soit majoritairement un phosphate de calcium.

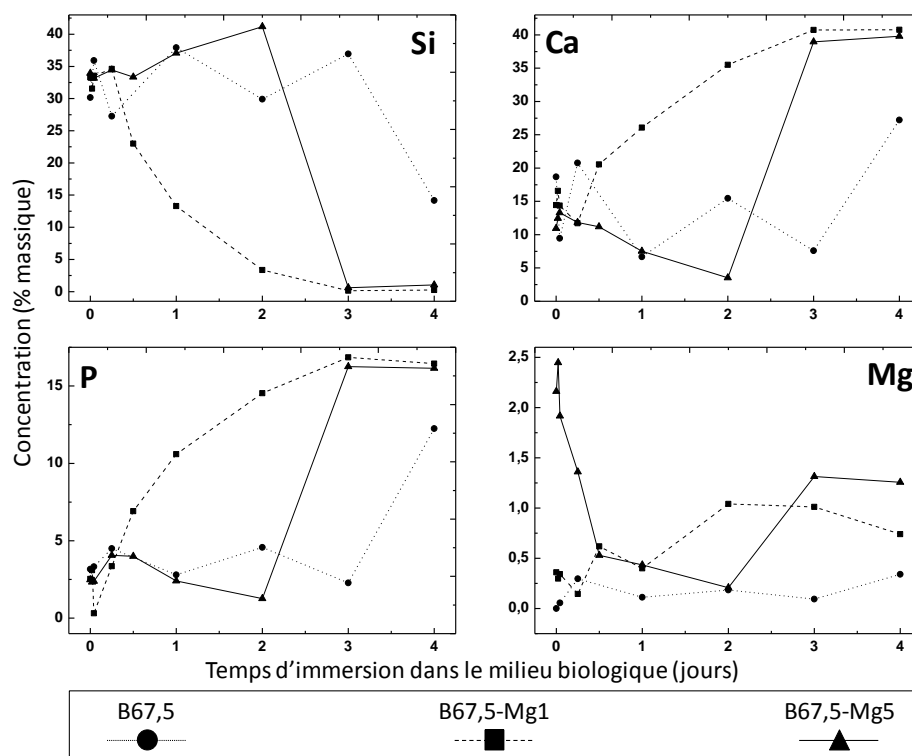


Figure 7-10 : Evolution des concentrations en silicium, calcium, phosphore et magnésium dans la région intérieure des grains de verre B67,5 ; B67,5-Mg1 et B67,5-Mg5.

7.3 Evolution de la composition du milieu biologique

Les concentrations en silicium, calcium, phosphore et magnésium dans le milieu biologique ont été mesurées par ICP-AES lors de chaque délai d'immersion des matériaux et leurs évolutions sont présentées pour les verres binaires (Figure 7-11) et ternaires (Figure 7-12) dopés 0%, 1% et 5%.

En ce qui concerne le silicium, le milieu évolue de la même manière pour les 6 verres : la quantité de silicium augmente à mesure que la matrice vitreuse se dissout. Les évolutions du silicium dans le milieu biologique sont très proches pour les trois verres binaires, alors que pour les verres ternaires, la cinétique semble nettement accélérée pour le verre non dopé : la dissolution de la matrice vitreuse est ralentie par l'ajout de magnésium.

Pour le calcium, le processus se décompose en plusieurs étapes, relativement bien corrélées avec les mesures obtenues par micro-PIXE. Dans un premier temps intervient une augmentation de la concentration, liée à la désalcalinisation des verres : un maximum est alors observé (entre 1 heure et 6 heures pour les verres binaires et entre 1 heure et 3 jours pour les

verres ternaires). Dans un deuxième temps, la quantité de calcium décroît du fait de la formation de la couche Ca-P-Mg décrite précédemment, et qui 'puise' ces éléments dans le DMEM. Finalement une troisième étape a lieu, propre aux verres binaires : la concentration en Ca croît de nouveau car la couche se dissout, comme cela a été démontré par les cartographies chimiques.

La concentration en phosphore diminue continuellement au cours de l'interaction pour la série des verres B75. En effet, le milieu biologique est la seule source du phosphore potentielle à la formation de la couche Ca-P. Dans le cas des verres ternaires, le phosphore suit la tendance du calcium, conduisant ainsi à des phosphates de calcium. Enfin l'évolution du magnésium suit trois voies distinctes suivant l'importance du dopage. Un relargage significatif de magnésium est en effet observé pour les verres dopés 5%, alors que la concentration reste relativement stable pour les verres dopés 1%, et qu'elle diminue pour les verres non dopés.

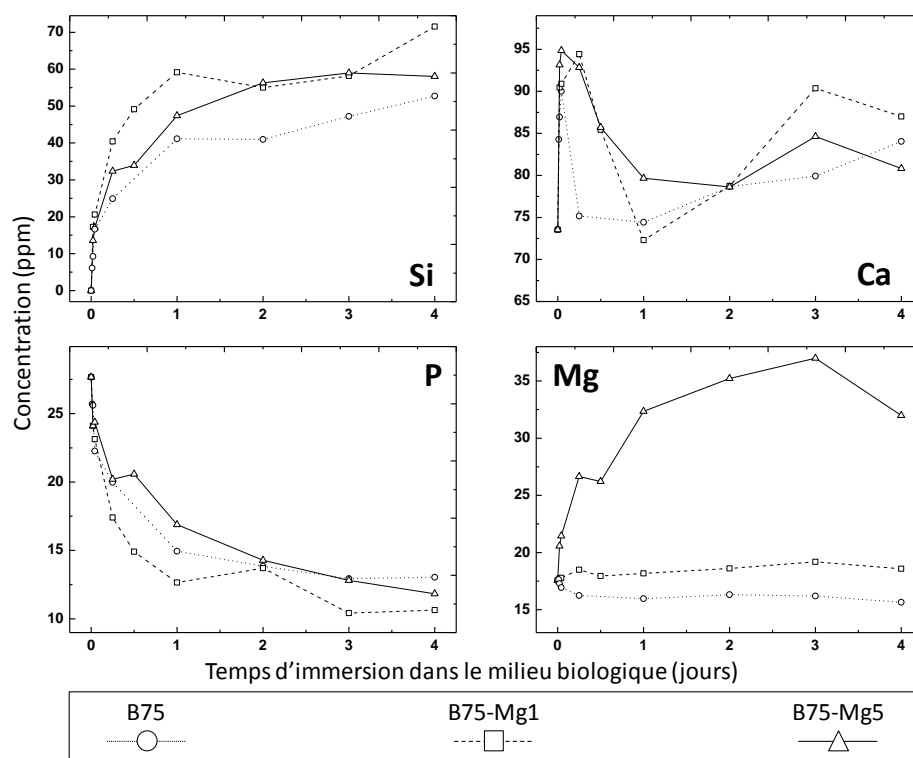


Figure 7-11 : Evolution des concentrations en silicium, calcium, phosphore et magnésium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les verres B75, B75-Mg1 et B75-Mg5.

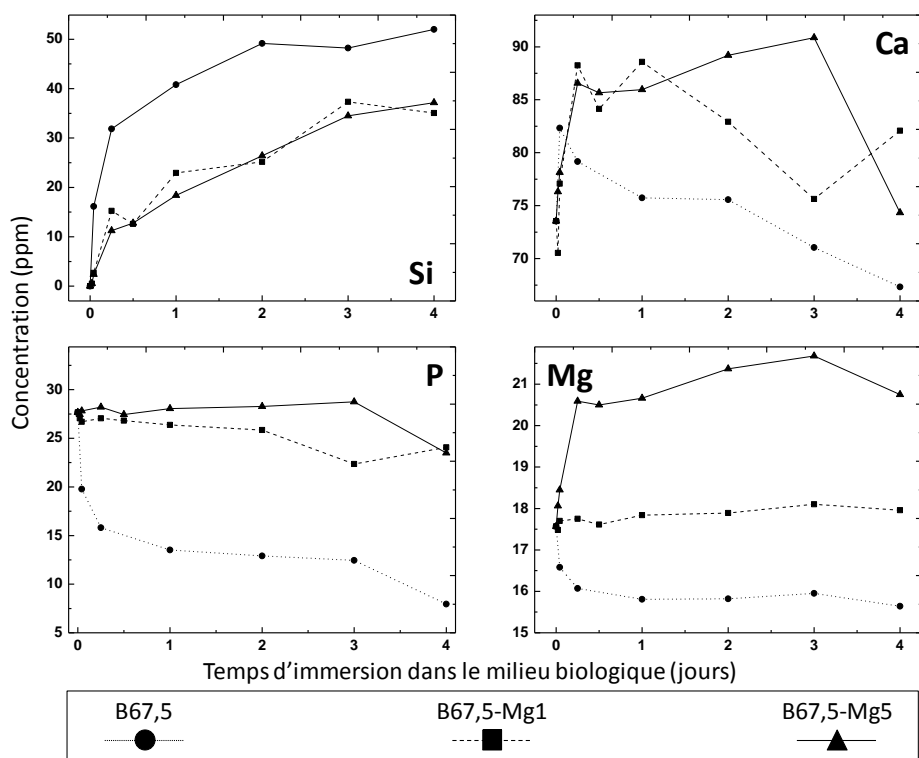


Figure 7-12 : Evolution des concentrations en silicium, calcium, phosphore et magnésium dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les verres B67,5 ; B67,5-Mg1 et B67,5-Mg5.

7.4 Discussion

Les informations liées aux variations des concentrations élémentaires (dans les grains de verre, et dans le milieu), démontrent déjà que le dopage en magnésium affecte les réactions physico-chimiques lors de l'immersion dans le DMEM. C'est par exemple le cas pour l'étape de dissolution du réseau silicate qui semble ralentie quand la quantité de magnésium augmente dans la composition du verre initial. Cette corrélation a déjà été observée par *Vallet-Regi et al.*¹²⁹ dans le même type de verre. D'après la théorie de Zachariassen¹³⁰, calcium et magnésium sont classés parmi les oxydes modificateurs de réseau. On peut donc dire qu'en théorie, la substitution de l'oxyde de calcium par l'oxyde de magnésium ne modifie pas en théorie la balance formateur (Si, P) modificateur (Ca, Mg). De manière pratique, cette balance est légèrement modifiée, car nous avons réalisée une substitution massique et non pas théorique (tableau 7-1). Ces variations sont très faibles et favorisent les oxydes formateurs au profit des oxydes modificateurs à mesure que le pourcentage en magnésium augmente. D'après ce critère, la dissolution des verres serait plus rapide pour les verres les plus dopés.

Rapports atomiques (oxydes modificateurs) / (oxydes formateurs)		
Pourcentage massique en oxyde de magnésium	B75	B67,5
0	0,35	0,37
1	0,36	0,38
5	0,38	0,4

Tableau 7-1 : Rapports atomiques des oxydes formateurs / oxydes modificateurs pour les verres binaires et ternaires dopés en oxyde de magnésium.

Parallèlement, une étude théorique utilisant la dynamique moléculaire, et menée par Pedone et *al.*¹³¹ suggère que la connectivité du réseau reste similaire lors de la substitution du calcium par le magnésium, c'est-à-dire dominée par des espèces Q^2 du silicium. Dans cette nomenclature, Q^n représente le silicium entouré par quatre atomes d'oxygène et n (variant de 0 à 4) indique le degré de connectivité (i.e. le nombre d'atomes de silicium auxquels il est lié *via* des oxygènes pontants). Cette même étude démontre par ailleurs que la coordination du silicium est préférentiellement assurée par le magnésium pour les espèces Q^0 , alors qu'elle est assurée par le calcium pour les espèces Q^n avec $n > 1$. Cette différence structurale pourrait expliquer une dissolution plus lente pour les verres dopés en magnésium. Les effets observés sur la dissolution de ces verres résultent donc d'une compétition entre ce phénomène structural et la prépondérance des oxydes formateurs au profit des oxydes modificateur à mesure que le pourcentage en oxyde de magnésium augmente.

Outre la dissolution, plusieurs points restent à éclaircir, en particulier l'évolution temporelle de la composition de la couche phosphocalcique vers celles des phases cristallines de l'os, notamment l'hydroxyapatite. Deux approches complémentaires peuvent être suivies pour répondre à cette question. D'un point de vue local, le calcul du rapport atomique $(Ca+Mg)/P$ à l'interface verre/milieu biologique permet la comparaison des cinétiques d'évolution de la couche Ca-P-Mg. D'un point de vue global, on peut combiner les résultats d'ICP-AES et des mesures de pH pour évaluer le potentiel de chaque verre à former une couche d'hydroxyapatite, *via* l'étude des sursaturations des solutions physiologiques.

Rapport (Ca+Mg)/P

Les phosphates de calcium amorphes constituent des phases transitoires pendant la formation d'hydroxyapatite : ce sont les premières phases qui précipitent dans les solutions sursaturées contenant des ions calcium et phosphates¹³². Cependant, l'hydroxyapatite est thermodynamiquement le plus stable et le moins soluble des phosphates de calcium à pH physiologique^{133,134}. Le rapport atomique Ca/P donne donc une indication essentielle sur l'évolution de la couche phosphocalcique. Dans notre cas, le rapport (Ca+Mg)/P a été préféré car le magnésium peut se substituer au calcium dans plusieurs phosphates de calcium cristallisés le Phosphate TriCalcique (TCP)¹³⁵. Les courbes se rapportant aux verres binaires et ternaires sont présentées sur la Figure 7-13. Elles sont comparées au rapport Ca/P de l'hydroxyapatite stœchiométrique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Ce dernier vaut **1,67**. L'évolution du rapport (Ca+Mg)/P suit pour les six verres une décroissance exponentielle. Le ratio initial est plus important pour les verres binaires que pour les ternaires, car ils contiennent initialement plus de phosphore.

Dans le cas des verres binaires, la première étape (décroissance) intervient entre 0 et 6 heures pour le verre B75, entre 0 et 1 jour pour le verre B75-Mg1 avec un minimum de 2,15 et entre 0 et 12 heures pour le verre B75-Mg5 avec un minimum de 3,24. La deuxième étape, qui correspond avec une augmentation du ratio, coïncide avec le début de la dissolution de la couche. Ces courbes nous donnent trois informations importantes : i) La composition des phases phosphocalciques de la couche ne correspond pas à celle de l'hydroxyapatite, ii) Ces phases se dissolvent du fait de leur faible stabilité, certainement liée au manque de phosphore dont la seule source est le DMEM, iii) Le dopage des verres en magnésium stabilise ces phases et ralentit leur dissolution.

Pour les verres ternaires dopés, après 12 heures de décroissance, le rapport (Ca+Mg)/P tend vers la valeur nominale de l'hydroxyapatite stœchiométrique, ce qui n'est pas le cas pour le verre B67,5 dont les quatre dernières valeurs sont plus élevées que pour les verres B67,5-Mg1 et B67,5-Mg5.

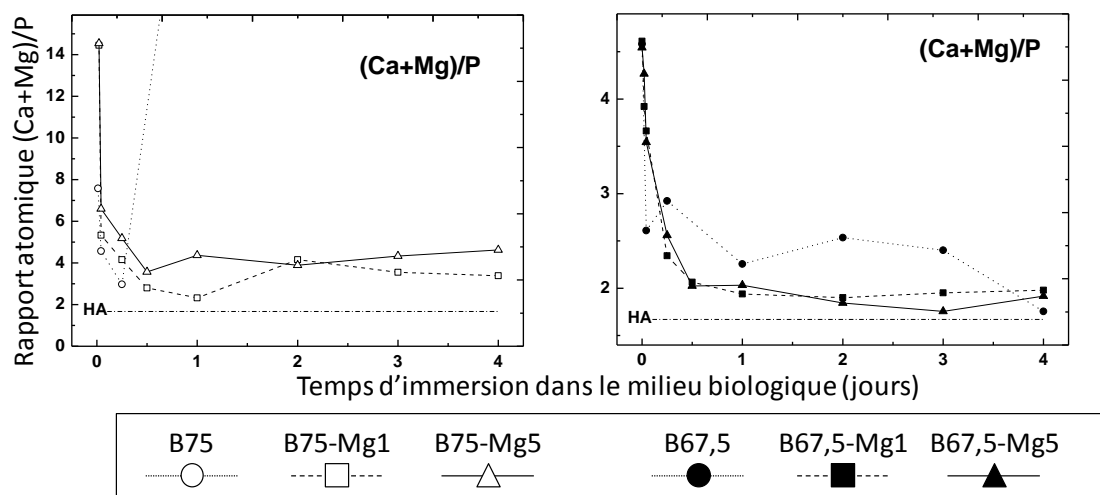


Figure 7-13 : Evolutions des rapports atomiques (Ca+Mg)/P en surface des grains de verres binaires et ternaires dopés en magnésium.

Rapport Ca/Mg

Les rapports atomiques Ca/Mg calculés dans la couche sont en accord avec l'évolution élémentaire du magnésium dans le DMEM. Ils évoluent en effet de manière différente suivant le dopage en magnésium (Figure 7-14) : i) Le ratio décroît pour le verre non-dopé, ii) il est quasi-constant pour les verres dopés 1%, iii) il augmente pour les verres dopés 5%. Les courbes semblent tendre vers la valeur moyenne des rapports des verres dopés 1%, malgré une diminution après 3 jours pour les verres binaires, cette dernière étant due à la dissolution de la couche.

Il est intéressant de comprendre pourquoi il y a une limite supérieure à la quantité de magnésium qui peut être incorporée dans la couche. Ce phénomène pourrait être expliqué par une étude récente¹³⁵ sur des phosphates de calcium diphasiques substitués en magnésium, et préparés par voie sol-gel. Deux phases sont principalement formées : hydroxyapatite et le phosphate tricalcique β (β -TCP). Les résultats obtenus par diffraction des rayons X et affinement Rietveld mettent en évidence que la quantité de β -TCP est linéairement dépendante du pourcentage atomique de magnésium introduit. Or, il est connu que la solubilité du β -TCP est plus importante que celle de l'hydroxyapatite. En conséquence, il est possible que l'augmentation du pourcentage de magnésium dans nos verres, conduise à la formation de β -TCP, dont le rapport atomique Ca/P est de **1,5**. Ce dernier se dissolvant au cours du temps, il permet la formation d'une couche majoritairement composée

d'hydroxyapatite. Cette hypothèse confirmée sur des verres de même nature par Vallet-Regi *et al.*¹²⁹ permettrait par ailleurs d'expliquer la stabilité accrue de la couche pour les verres binaires en présence de magnésium. En effet, le rapport Ca/P du β -TCP étant plus faible que celui de l'hydroxyapatite (*a fortiori* si le magnésium est substitué au calcium), cette phase nécessite moins de phosphore et peut donc être formée transitoirement, bien que le milieu soit déficient en phosphore.

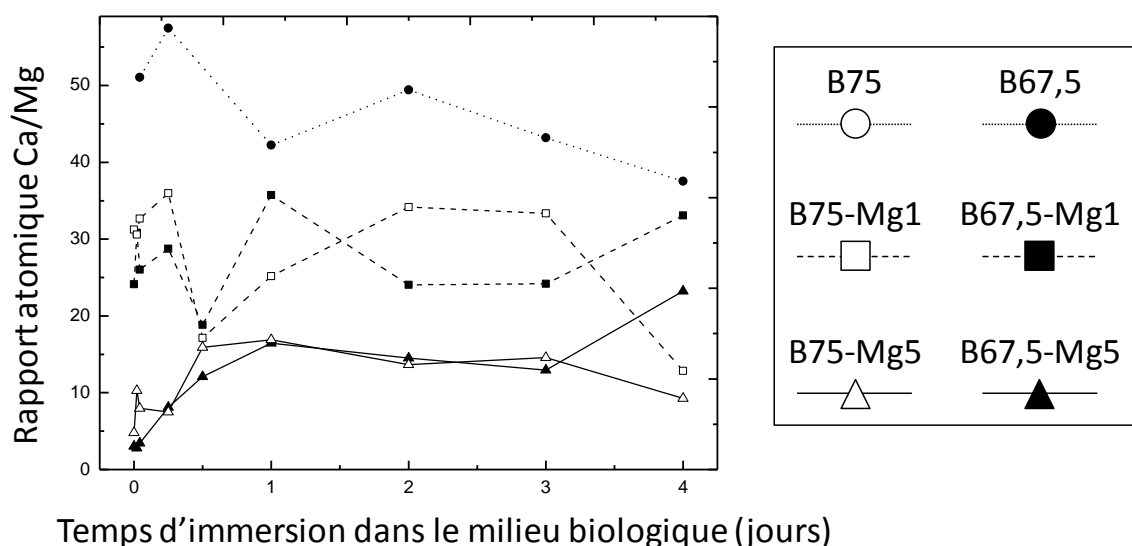
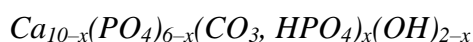


Figure 7-14 : Evolution du rapport atomique Ca/Mg en périphérie des grains de verres binaires et ternaires dopés en magnésium.

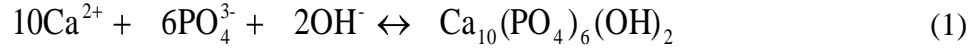
Sursaturation de la solution

Nous avons vu dans le Chapitre 2 que les processus bioactifs permettent la formation de nanocristaux d'une hydroxyapatite déficiente en calcium, de formule générale :



Au sein de cette phase, des substitutions ont lieu au profit des ions carbonates, hydrogénophosphates, alcalins et alcalino-terreux. Les échanges ioniques intenses entre les verres et le milieu provoquent ainsi d'important changement dans l'état de saturation du milieu biologique vis-à-vis du minéral formé. Le suivi de cet état de saturation fournit des informations précieuses quant à la capacité de chacun des verres à former une couche apatitique. Le calcul de cet état de saturation est cependant délicat pour plusieurs raisons : à cause de l'hétérogénéité de cristallisation des apatites biologiques d'une part, et de la difficulté à déterminer avec exactitude l'importance des substitutions ioniques dans les cristaux d'apatite d'autre part.

Pour ces raisons, il est commode d'effectuer le calcul de l'état de saturation du milieu biologique vis-à-vis de l'hydroxyapatite stœchiométrique $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Ce sont alors les tendances relatives observées dans l'évolution de l'état de saturation du milieu qui vont constituer un critère d'évaluation de l'aptitude à induire la formation d'hydroxyapatite *in vitro*. La formation d'hydroxyapatite s'effectue selon :



Le produit d'activité ionique Q est défini à partir des activités des différentes espèces ioniques comme étant :

$$Q = a_{Ca^{2+}}^{10} \cdot a_{PO_4^{3-}}^6 \cdot a_{OH^-}^2 \quad (2)$$

$$Q = \gamma_{Ca^{2+}}^{10} \cdot [Ca^{2+}]^{10} \cdot \gamma_{PO_4^{3-}}^6 \cdot [PO_4^{3-}]^6 \cdot \gamma_{OH^-}^2 \cdot [OH^-]^2$$

où les coefficients d'activité γ_i traduisent les interactions entre l'espèce i et les autres constituants du système ; ils dépendent de la force ionique de la solution, du pH et de la température. Nous pouvons alors définir IS , indice de saturation de la solution vis-à-vis de l'hydroxyapatite selon :

$$IS = \frac{Q}{K_{sp}} \quad (3)$$

où K_{sp} est le produit de solubilité de l'hydroxyapatite. K_{sp} n'est autre que la valeur du produit d'activité ionique lorsque la solution et la phase solide décrites dans la réaction (1) sont à l'équilibre. Le produit de solubilité K_{sp} de l'hydroxyapatite stœchiométrique en milieu aqueux est estimé à $2,35 \cdot 10^{-59}$ à 37 °C, d'après Lu *et al.*¹³⁴

L'indice IS renseigne sur l'état de saturation de la solution. Sa connaissance permet de prévoir l'évolution du système dans la mesure où celui-ci tend à l'équilibre thermodynamique. C'est le cas lorsque $Q = K_{sp}$: la solution et la phase solide sont à l'équilibre. Lorsque $Q < K_{sp}$, la solution est dite sous-saturée par rapport au minéral ; il y a alors dissolution de ce dernier. Lorsque $Q > K_{sp}$, la solution est sursaturée par rapport au minéral et la réaction (1) bascule préférentiellement dans le sens de la précipitation.

D'après l'équation (3), l'indice de saturation IS évolue linéairement avec le produit d'activité ionique Q . Le calcul de celui-ci nécessite donc uniquement la connaissance des coefficients d'activité et des concentrations.

Sur la base des travaux de Ohtsuki, Kokubo et Yamamuro, les valeurs des coefficients d'activité γ_i sont connues pour une solution physiologique¹³⁶ : les coefficients γ_i valent respectivement 0,36 pour Ca^{2+} , 0,06 pour PO_4^{3-} et 0,72 pour OH^- . Les concentrations en calcium et en phosphore sont connues grâce aux mesures par ICP-AES, tandis que la quantité d'ions hydroxyles présents dans le milieu est déduite des mesures de pH qui ont été réalisées pour chacun des échantillons. Les indices de saturation des verres binaires et ternaires sont représentés sur la Figure 8-15.

Il est connu que les fluides biologiques et physiologiques sont initialement sursaturés vis-à-vis de l'hydroxyapatite dans des conditions normales^{132,134}. En conséquence, la précipitation est favorisée et interviendra préférentiellement à la surface de verres bioactifs, qui offrent des sites de nucléation optimisés, spécialement grâce des faibles énergies interfaciales permises par le développement de gel de silice poreux à la surface des verres (Etape 3 du processus de bioactivité)^{137,138}.

Au début des interactions et pour les six verres, l'indice de sursaturation augmente plus rapidement pour les verres non dopés (1 heure) que pour les verres dopés (6 heures), ce qui confirme que la dissolution du verre est ralentie par le dopage en magnésium. Après ce maximum, l'indice de sursaturation décroît au cours du temps, ce qui indique que les ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et OH^- sont incorporés à la surface du verre, alimentant la croissance de l'hydroxyapatite. La décroissance de l'indice est par ailleurs plus lente pour les verres dopés, ce qui démontre que la formation d'hydroxyapatite reste favorisée plus longtemps lorsque le dopage est plus important.

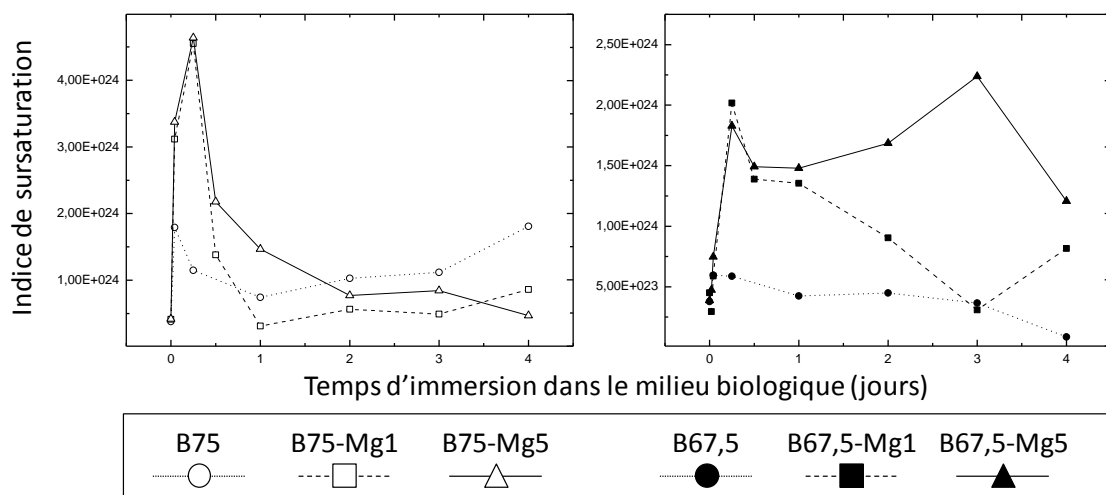


Figure 7-15 : Evolution des indices de sursaturation des verres binaires et ternaires dopés en magnésium.

Bilan des interactions physico-chimiques pour les verres dopés en magnésium :

- *Le processus physico-chimique se décompose en trois étapes chronologiques: relargage des alcalino-terreux, dissolution de la matrice vitreuse, précipitation de phases phosphocalciques.*
 - *L'étape de dissolution est ralentie lorsque le verre est dopé en magnésium. Cela peut s'expliquer par le fait que le magnésium, contrairement au calcium, se coordonne préférentiellement aux atomes de silicium dont le degré de connectivité est faible.*
 - *La précipitation des phases phosphocalciques intervient dans un premier temps sous forme de couche. Cette couche se dissout pour les verres binaires et s'étend à l'ensemble du grain pour les verres ternaires. Dans les deux cas, le magnésium est intégré à ces phases phosphocalciques et les stabilise dans le temps, retardant ainsi leur dissolution dans le cas du verre binaire.*
 - *La composition des phases phosphocalciques évolue in fine vers une composition de type apatitique. La présence de magnésium semble favoriser la formation d'une phase transitoire de phosphate tricalcique.*
-

Chapitre 8 Verres ternaires dopés en zinc

8.1 Cartographies chimiques

Comme pour les matériaux contenant du magnésium, les évolutions des verres dopés avec 1% et 5 % d'oxyde de zinc ne sont pas différenciables visuellement sur les cartographies élémentaires. Ce comportement similaire s'écarte en revanche du verre non dopé. L'homogénéité chimique des verres initiaux B67,5 et B67,5-Zn1 peut être vérifiée sur la Figure 8-1.

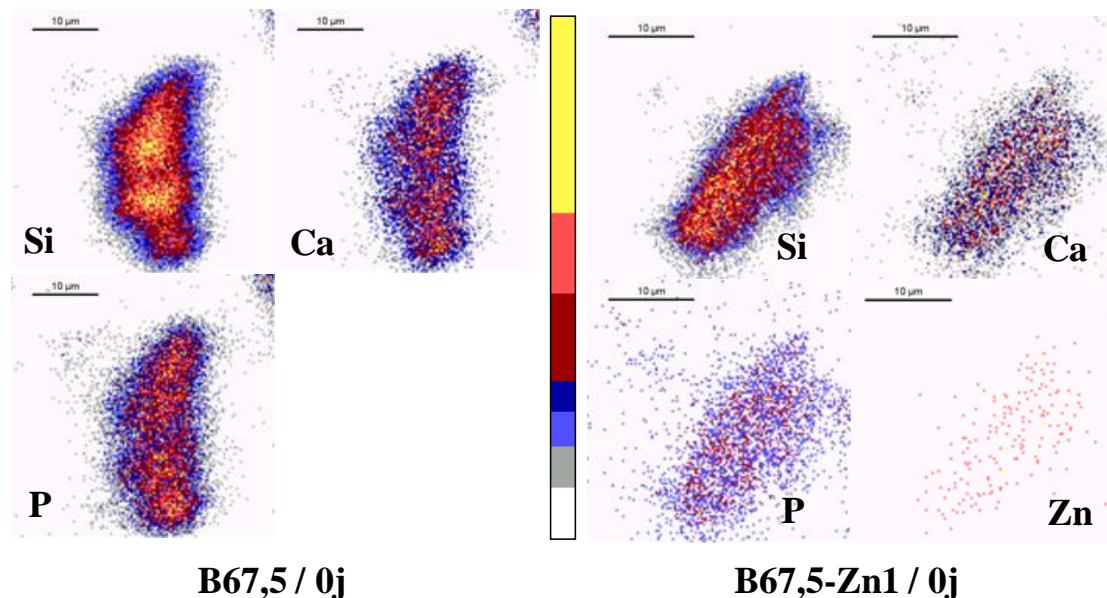


Figure 8-1 : Distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et zinc dans des grains de verres B67,5 et B67,5-Zn1, avant interaction avec le milieu biologique.

La Figure 8-2 représente quant à elle ces mêmes matériaux après 2 jours d'immersion dans le DMEM. Alors qu'une couche Ca-P est aisément distinguable de la région intérieure (riche en Si) pour le verre non dopé, le calcium et le phosphore sont prépondérants dans tout le grain pour les verres dopés, au détriment du silicium. Il est utile de préciser que dans le cas des verres dopés, aucune couche n'est visible sur une cartographie pour un délai antérieur. Pour comparaison, le premier délai pour lequel la couche est visible sur les verres B67,5 est 1 jour.

Finalement, après 4 jours d'immersion, les grains de verre B67,5 sont eux aussi totalement transformés en phosphate de calcium. Par ailleurs, bien que l'intensité du signal du zinc soit faible, sa répartition au sein du matériau semble avoir été homogène au cours du temps.

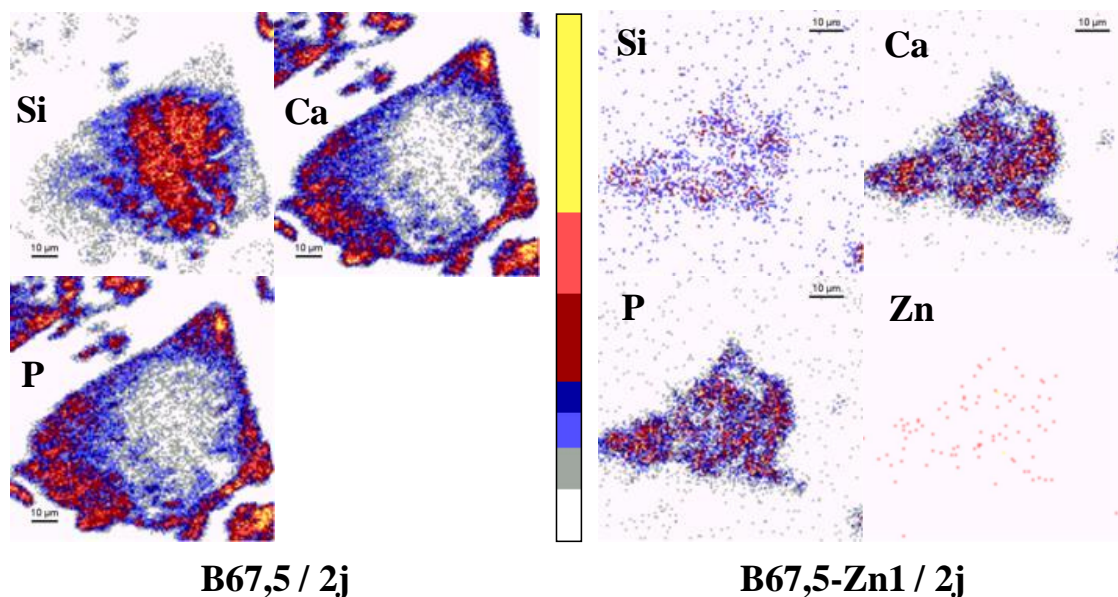


Figure 8-2 : Distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et zinc dans des grains de verres B67,5 et B67,5-Zn1, après 2 jours d'interaction avec le milieu biologique.

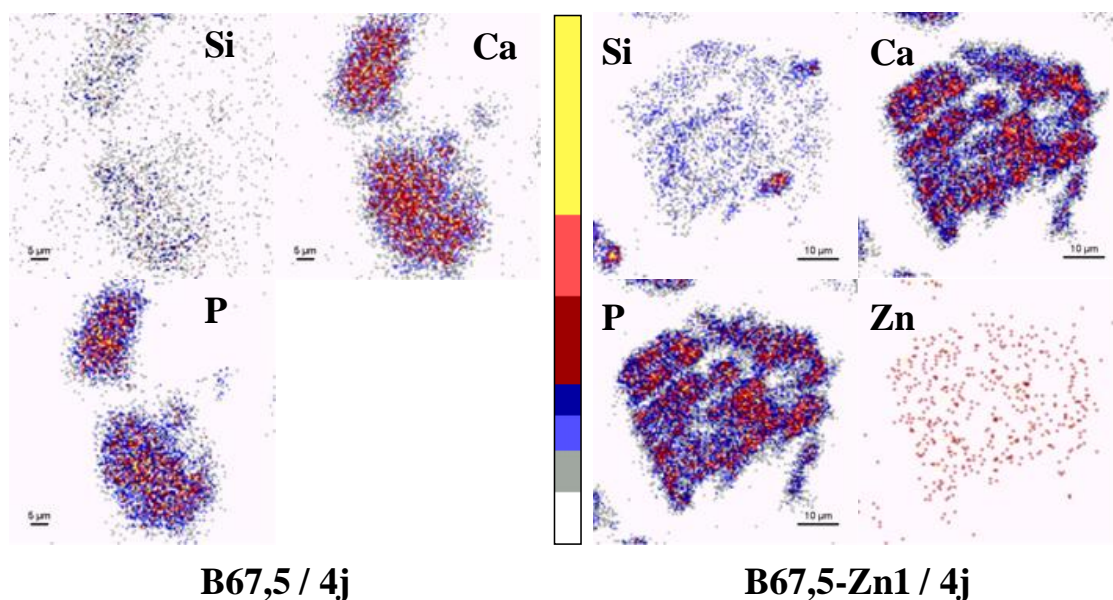


Figure 8-3 : Distribution des éléments silicium, calcium, phosphore et zinc dans des grains de verres B67,5 et B67,5-Zn1, après 4 jours d'interaction avec le milieu biologique.

8.2 Evolution des concentrations chimiques au sein des grains de verres

8.2.1 Zone périphérique des grains

L'analyse élémentaire de la périphérie des grains des verres B67,5 ; B67,5-Zn1 et B67,5-Zn5 est présentée sur la Figure 8-4. Intéressons nous dans un premier temps à la désalcalinisation du réseau vitreux. Les cinétiques des différents verres sont difficiles à séparer, mais cette étape prend fin au bout d'une heure dans les trois cas avec un maximum de Si et un minimum de Ca.

La deuxième étape chronologique, correspond à la décroissance du silicium (respectivement croissance du calcium et du phosphore). Durant celle-ci, on observe la coexistence de deux phénomènes en compétition. En effet, il semble que dans un premier temps, la concentration en silicium diminue plus rapidement pour le verre B67,5 (jusqu'à 12h), puis la tendance s'inverse, et les verres dopés voient leur pourcentage de silicium s'approcher de zéro après seulement un jour d'interaction. L'effet inverse est logiquement identifiable pour les concentrations en phosphore et en calcium et le phosphore dont les cinétiques de croissance sont plus importantes pour les verres dopés à partir de 12h.

Enfin dans la dernière phase de cette évolution, les concentrations se stabilisent après avoir atteint un maximum pour les éléments Ca et P et un minimum pour Si. Ce phénomène se situe globalement entre 1 et 4 jours. La concentration en zinc, qui fluctue au gré des processus des deux premières étapes, se stabilise elle aussi au cours de la dernière étape. Il est à noter que le rapport 1/5 des concentrations nominales en zinc, des verres initiaux B67,5-Zn1 et B67,5-Zn5 se maintient au cours du processus.

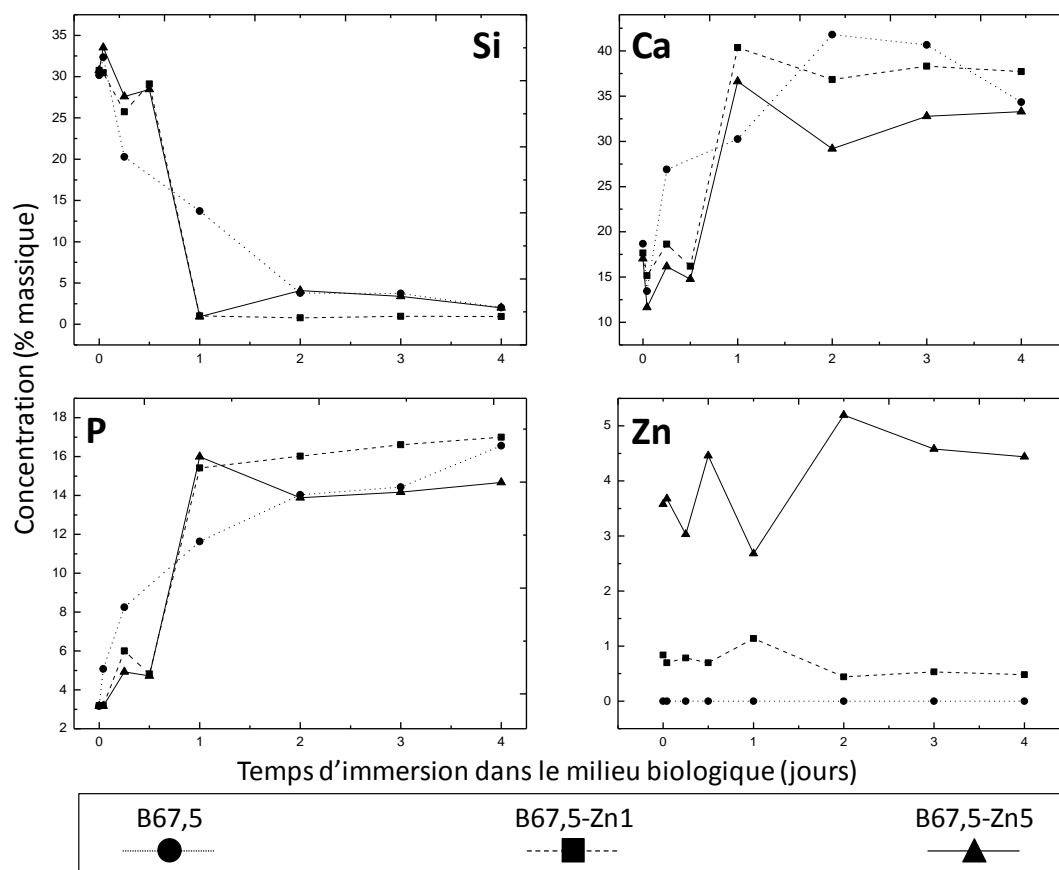


Figure 8-4 : Evolution des concentrations en silicium, calcium, phosphore et zinc à la périphérie des grains de verre B67,5 ; B67,5-Zn1 et B67,5-Zn5.

8.2.2 Cœur des grains

L'évolution chimique au cœur des grains, représentée Figure 8-5, est en totale adéquation avec les différences marquées entre verres dopé et non dopés, mises en évidence sur les cartographies chimiques. En effet, la diminution de la concentration en silicium et les augmentations en calcium et phosphore interviennent avant 1 jour. Ces phénomènes qui traduisent la précipitation d'une phase phosphocalcique, suivent quasiment la même cinétique que celle de la zone périphérique. A l'instar de la périphérie du grain, ce phosphate de calcium semble stable entre 1 jour et 4 jours pour les verres B67,5-Zn1 et B67,5-Zn5. A contrario, l'apparition de cette phase au cœur du grain est décalée dans le temps pour le matériau non dopé comme le démontrent les courbes du verre B67,5. En effet, les pourcentages de calcium et phosphore restent relativement bas, avant d'augmenter à partir de 3 jours. Confirmant l'hypothèse d'une évolution spatiale plus rapide pour les verres dopés, les

concentrations en zinc suivent les mêmes tendances que celles observées à l'interface. Le rapport des concentrations en zinc reste lui-aussi globalement le même.

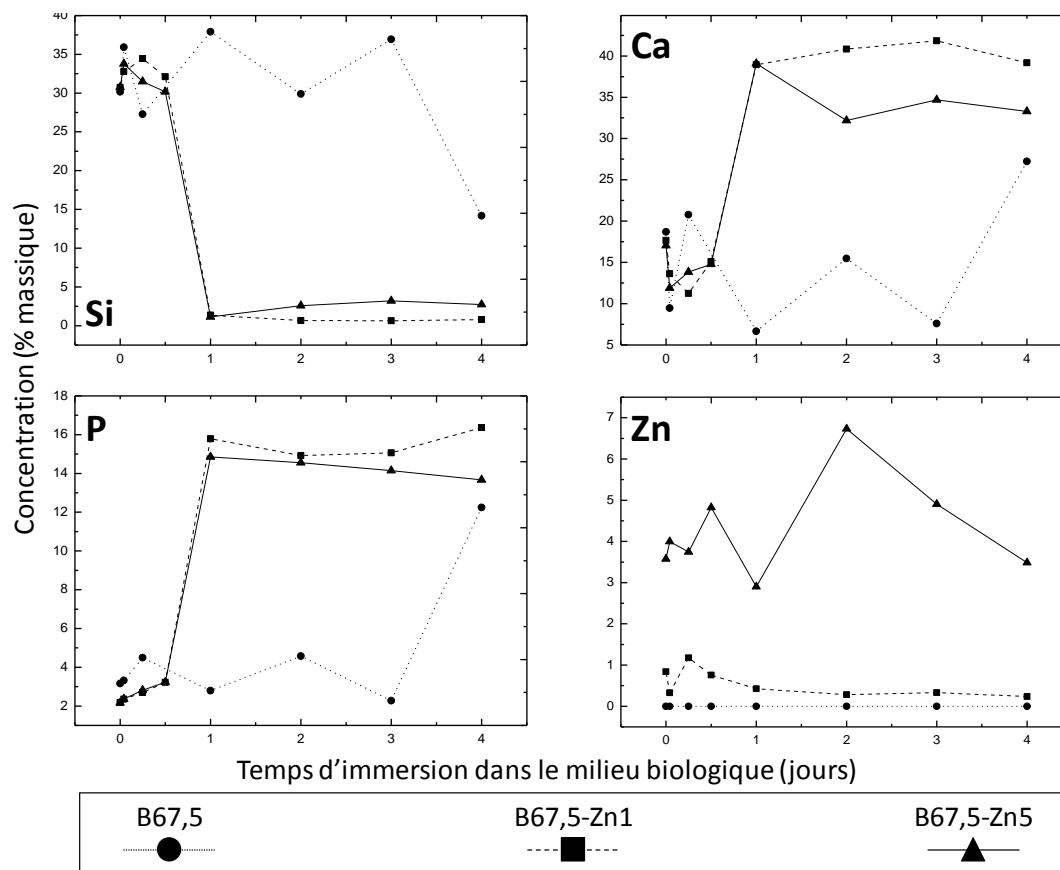


Figure 8-5 : Evolution des concentrations en silicium, calcium, phosphore et zinc dans la région intérieure des grains de verre B67,5 ; B67,5-Zn1 et B67,5-Zn5.

8.3 Evolution de la composition du milieu biologique

L'analyse du milieu biologique pour les différents délais nous fournit des informations complémentaires aux données obtenues par micro-faisceau d'ions. Les évolutions élémentaires du DMEM sont présentées sur la Figure 8-6. Plusieurs tendances émergent clairement de ces données :

i) La désalcalinisation est d'autant plus rapide que le dopage en zinc est faible. En effet, la concentration en calcium atteint un maximum après 1h d'interaction pour le verre B67,5. Cette période est repoussée à 6 heures pour B67,5-Zn1 et le verre B67,5-Zn5 continue à relarguer du calcium après un jour d'immersion.

ii) Les évolutions du silicium pour les trois verres ont une cinétique similaire à celle du calcium : la rapidité de dissolution du réseau silicate est inverse à la quantité de zinc contenue initialement dans le matériau.

iii) De manière logique, le verre dopé 5% relargue plus de zinc dans le milieu biologique que le verre dopé 1%.

iv) Les concentrations en calcium et phosphore diminuent plus rapidement pour le verre non dopé, ce qui sous-entend une ‘consommation’ plus rapide pour la formation de phases phosphocalcique.

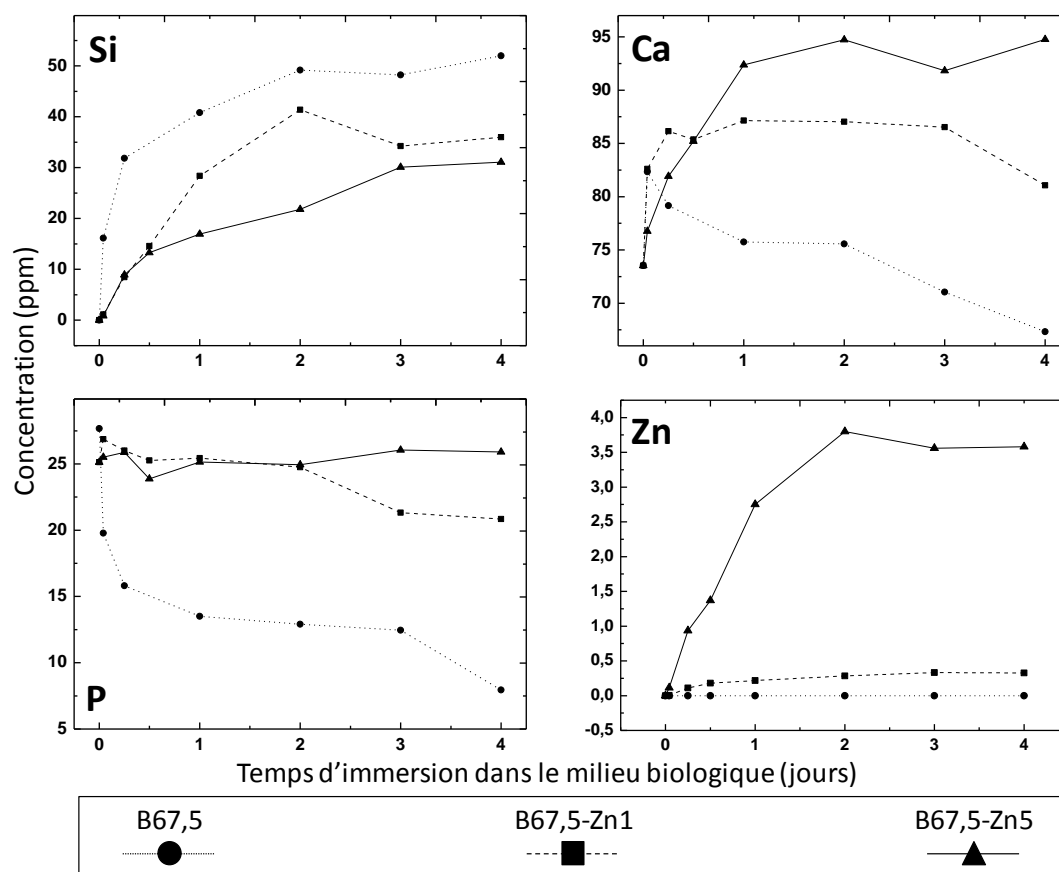


Figure 8-6 : Evolution des concentrations en silicium, calcium, phosphore et zinc dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les verres B75, B75-Mg1 et B75-Mg5.

8.4 Discussion

Nous avons vu dans les paragraphes précédents, que le déroulement des réactions physico-chimiques induites par l'immersion des verres dans le DMEM, est influencé par le dopage en zinc. Quel est son rôle dans ces différents processus ?

Intéressons nous dans un premier temps à la dissolution des verres. Les résultats montrent que cette dissolution est ralentie lorsque les verres sont dopés en zinc, et la cinétique est d'autant plus réduite que la quantité initiale de zinc est importante. Des études de Jaroch¹³⁹ et Aina¹⁴⁰ sur la dissolution de verres phosphocalciques dopés en zinc corroborent cette observation.

Dans la théorie de Zachariasen, l'oxyde de zinc est classé comme intermédiaire. Il peut en effet adopter deux configurations différentes au sein des verres : géométrie tétraédrique typique des oxydes formateurs et une géométrie octaédrique propre aux modificateurs. D'une manière générale, la configuration adoptée dépend de l'environnement de l'ion Zn^{2+} et notamment des autres oxydes présents et de leur balance formateur/modificateur¹⁴¹.

Dans le cas plus particulier des verres phosphocalciques, des résultats en résonance magnétique nucléaire et des simulations de dynamique moléculaire^{142,143}, démontrent que dans ces matériaux, la configuration du zinc est tétraédrique quelle que soit sa concentration. Un des points clés qui émerge de ces études, est la capacité du zinc à permettre l'insertion du phosphore dans le réseau vitreux tridimensionnel. En effet le phosphore, présent sous forme de tétraèdres isolés dans les verres phosphocalciques sans zinc, est incorporé progressivement à la matrice à mesure que la quantité de zinc augmente. Le réseau très ramifié de tétraèdres Si-Zn-P interconnecté est alors formé. La ramification du réseau augmentant avec le pourcentage de zinc, il est donc logique que la dissolution des verres soit favorisée de manière inverse.

En ce qui concerne la précipitation de phosphate de calcium, une première question se pose sur l'évolution spatiale de ce précipité. En effet, alors que ces derniers se limitent à la périphérie dans un premier temps pour le verre non dopé, aucune couche n'est observée pour les verres contenant du zinc. Une hypothèse serait de lier ce phénomène à l'effet du zinc sur la formation de l'hydroxyapatite. En effet le travail de Pereira et Hench¹⁴⁴ reflète un éventuel pouvoir inhibiteur du zinc sur la formation d'hydroxyapatite. Cette influence est corrélée par deux de nos résultats. Le premier d'entre eux est l'évolution de l'indice de sursaturation

(Figure 8-7). Cet indice est maximal après 1 heure d'interaction pour le verre non dopé. Ce maximum est décalé dans le temps pour les verres dopés, puisqu'il intervient après 6 heures pour le verre B67,5-Zn1 et après 1 jour pour le verre B67,5-Zn5. L'hydroxyapatite a donc tendance à précipiter plus tôt pour les verres sans zinc.

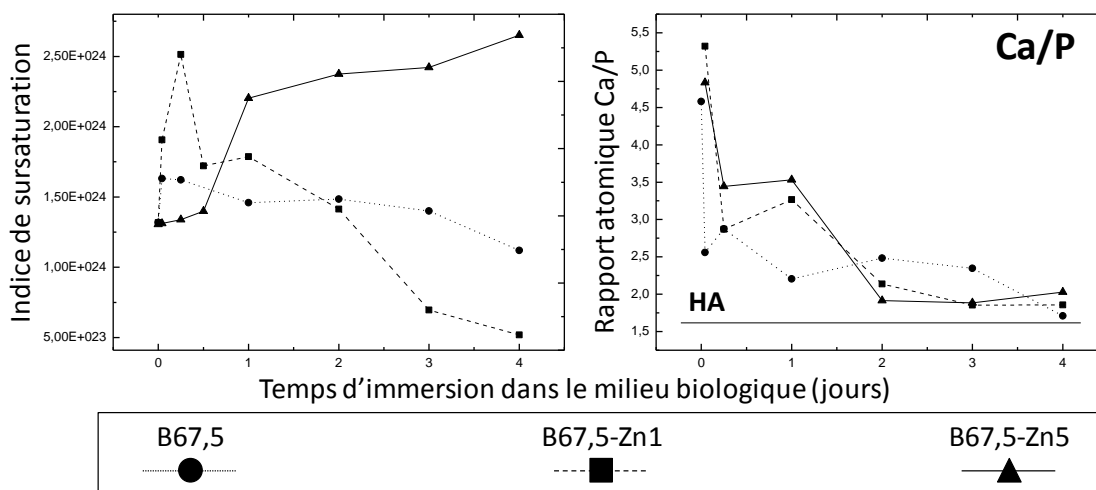


Figure 8-7 : Evolution de l'indice de sursaturation du milieu biologique et des rapports atomiques Ca/P en surface des grains de verre B67,5 ; B67,5-Zn1 et B67,5-Zn5.

Le deuxième résultat qui confirme cette tendance est l'évolution du rapport Ca/P au cours du temps. Contrairement au magnésium, on considère bien le rapport Ca/P et non le rapport (Ca+Zn)/P, car il a été démontré récemment¹⁴⁵, que le Zn^{2+} ne se substituait pas au calcium, mais était inséré en site interstitiel. Ces ions Zn^{2+} sont donc en excès et ne doivent pas être pris en compte dans le calcul du rapport Ca/P pour suivre la formation d'apatite.

Sur la Figure 8-7, on voit clairement que ce rapport diminue plus rapidement pour le verre sans zinc, atteignant ainsi plus tôt une valeur proche de celle de l'hydroxyapatite (2,20, à 1 jour contre respectivement 3,26 et 3,51 pour les verres B67,5-Zn1 et B67,5-Zn5). Le temps de formation de l'apatite est en adéquation avec la quantité de zinc présente dans le liquide biologique : plus la concentration en zinc est importante, plus la précipitation de l'apatite est retardée.

Pour plus de précision, il est nécessaire de savoir sur quelle étape de la formation d'apatite influe le zinc. Deux publications^{146,147} portant sur les cinétiques de croissance de monocristaux dans des solutions physiologiques, ont démontré que le taux de croissance est réduit de 70% lorsque des ions Zn^{2+} sont ajoutés à hauteur de $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans ces solutions et l'épaisseur de la couche d'hydroxyapatite pure formée diminue de 95%. Le taux de nucléation reste néanmoins inchangé quelque soit la concentration du milieu en zinc.

Ces données nous permettent d'avancer une hypothèse sur les différences de répartition en calcium et phosphore observées entre verre dopé et verres non dopés : en effet aucune couche n'est observée pour les verres B67,5-Zn contrairement au verre B67,5. Dans le premier cas, l'absence de Zn^{2+} dans le milieu biologique permet la croissance normale puis la coalescence des cristaux d'apatite à la surface du grain. Pour un taux de nucléation similaire, les ions Zn^{2+} ralentissent la croissance des cristaux d'apatite en surface, ce qui pourrait permettre une diffusion accrue du phosphore et du calcium vers le centre du grain via la porosité 'naturelle' de celui-ci. Ce mécanisme expliquerait alors la discrimination spatiale intervenant pour le verre B67,5 et absente pour les verres B67,5-Zn1 B67,5-Zn5).

Bilan des interactions physico-chimiques pour les verres ternaires dopés en zinc :

- *Le processus physico-chimique se décompose en trois étapes chronologiques: relargage du calcium, dissolution de la matrice vitreuse, précipitation de phases phosphocalciques.*
 - *La dissolution est retardée lorsque le verre est dopé en zinc. Le comportement formateur du zinc dans les verres phosphocalcique peut expliquer ce phénomène.*
 - *De manière similaire aux verres dopés en magnésium, on observe la précipitation de phases phosphocalciques dans lesquelles le zinc est intégré dans des concentrations proches de celles du verre initial.*
 - *Contrairement aux verres dopés en magnésium, aucune couche n'est observée, du fait de l'évolution spatiale très rapide de la phase phosphocalcique.*
 - *La formation d'une phase apatitique semble ralentie lorsque la concentration en zinc augmente. Plusieurs études ont en effet démontré un pouvoir inhibiteur du zinc sur la croissance de l'apatite.*
-

Chapitre 9 Comparaisons des cinétiques d'évolution structurale des verres dopés

Le but de ce chapitre est de comparer les évolutions structurales des phases phosphocalciques au cours du temps, pour les verres dopés en magnésium et en zinc. Les données dont nous disposons étant de nature élémentaire, nous avons vu qu'une information sur la nature des phases peut être obtenue via le rapport atomique Ca/P. Pour être plus précis, le rapport (Ca+Mg)/P peut nous permettre de comparer tous les verres dopés. En effet, le magnésium se substitue au calcium dans les phases phosphocalciques¹³⁵ (substitution très limitée pour l'apatite mais important pour le phosphate tricalcique), alors que le zinc en insertion¹⁴⁵ ne nous renseignera pas sur la nature des phases. Ce rapport (Ca+Mg)/P décroît de manière exponentielle à mesure que le temps d'immersion augmente, jusqu'à atteindre une valeur limite proche de la valeur caractéristique de l'apatite 1,67. Cette observation est valable pour tous les verres dopés et conventionnels, excepté le verre B75 dans lequel le précipité se dissout. Afin d'établir un point de comparaison sur l'aptitude des différents verres à induire la formation d'apatite, les cinétiques d'évolution du rapport Ca/P ont été modélisées à partir d'une loi exponentielle de type :

$$R_{Ca/P} = A \cdot \exp(-t/\tau) + R_{lim}$$

avec

$R_{Ca/P}$: valeur du rapport atomique Ca/P à l'interface verre bioactif/milieu biologique au bout d'une durée t d'interaction.

τ : constante de décroissance.

R_{lim} : valeur asymptotique du rapport atomique Ca/P.

A : amplitude du rapport atomique Ca/P.

La Figure 9-1 présente l'exemple d'ajustement de cette loi avec les mesures réalisées sur les grains de verre B67,5-Mg1. L'ajustement, basé sur la méthode des moindres carrés, a été

réalisé de manière itérative au moyen du logiciel OriginLab. Le Tableau 9-1 présente le comportement à la limite asymptotique ainsi que la constante de temps τ .

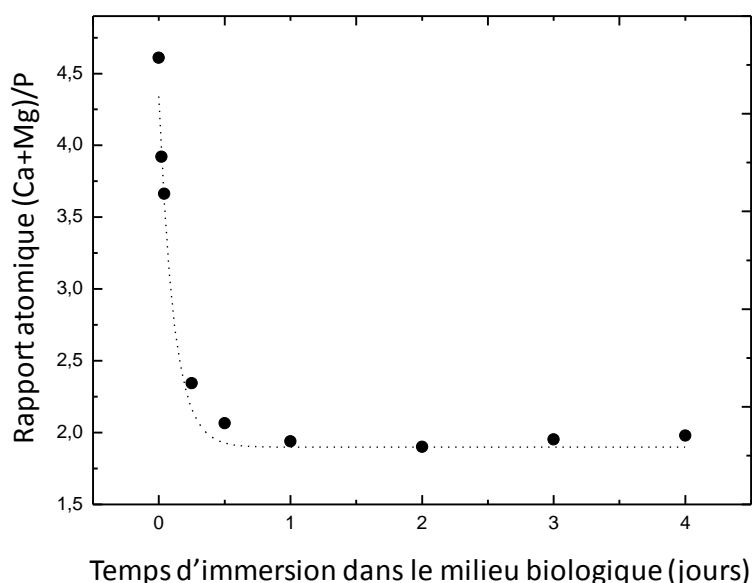


Figure 9-1 : Exemple d'ajustement de la loi exponentielle avec les mesures du rapport atomique $(Ca+Mg)/P$ pour les grains de verre B67,5-Mg1.

L'intérêt de cette modélisation mathématique réside en particulier dans la détermination du paramètre τ . Cette constante de temps nous permet d'évaluer la rapidité avec laquelle la couche de phosphate de calcium évolue vers une phase apatitique.

Plusieurs points importants émergent de la comparaison des paramètres τ .

- Le paramètre τ est plus important pour les verres dopés en magnésium et en zinc que pour leurs équivalents non-dopés. Le dopage des verres par l'un de ces deux éléments ralentit donc la cinétique d'évolution.
- Dans le cas des verres ternaires, le paramètre τ est plus de quatre fois supérieur pour les verres dopés en magnésium en comparaison des verres dopés en zinc. L'évolution vers une phase apatitique est donc extrêmement ralentie par le magnésium. Ce retard peut être attribué à la formation d'une phase intermédiaire de phosphate tricalcique, favorisée par le magnésium.

- Le dopage en magnésium ne modifie pas les cinétiques relatives des verres binaires et ternaires. Comme cela a déjà été démontré sur les verres sol-gel conventionnels, les verres binaires réagissent plus rapidement que les verres ternaires.

Les rapports asymptotiques $(Ca+Mg)/P$ permettent eux aussi de dégager des tendances :

- Les rapports $(Ca+Mg)/P$ verres dopés en zinc et en magnésium tendent vers une valeur plus proche de l'apatite que celle des verres non dopés.

- Les valeurs des rapports asymptotiques sont plus importantes pour les verres ternaires dopés en magnésium que pour les verres ternaires dopés en zinc, ce qui pourrait être dû à la persistance de phases phosphocalciques amorphes.

- Enfin, pour les verres dopés en magnésium, le rapport limite est plus de deux fois inférieur pour les verres ternaires. Cette valeur plus proche d'une phase apatitique s'explique par le déficit de phosphore auquel doivent faire face les verres binaires pour former les phases phosphocalciques.

Pour conclure ce chapitre, bien qu'il faille considérer cette modélisation avec les précautions nécessaires, elle nous a permis d'établir une **comparaison globale** des cinétiques d'évolution structurale.

	$R_{(Ca+Mg)/P} = A \exp(-t/\tau) + R_{lim}$	$R_{(Ca+Mg)/P}$	paramètre τ (heures)
	Limite asymptotique R_{lim}	Valeur expérimentale pour $t = 4$ jours	
B75	–	–	–
B67,5	2,37	1,75	0,45
B75-Mg1	3,39	3,38	0,29
B75 - Mg5	4,33	4,62	0,33
B67,5 - Mg1	1,98	1,97	2,62
B67,5 - Mg5	1,90	1,91	3,77
B67,5 - Zn1	1,75	1,76	0,48
B67,5 - Zn5	1,76	1,82	0,75

Tableau 9-1 : Limite asymptotique et valeur expérimentale finale du rapport atomique $(Ca+Mg)/P$. – Valeurs du paramètre τ .

Chapitre 10 Verres binaires et ternaires mésostructurés

10.1 Cartographies chimiques

Les cartographies élémentaires des verres mésostructurés sont présentées ci-dessous. Les cartographies des grains des verres binaires et ternaires (respectivement Figure 10-1 et Figure 10-4) avant immersion dans le DMEM confirment une répartition homogène des éléments constitutifs des verres initiaux.

La Figure 10-2 présente les verres binaires B75 et B75-F127 après 1h d'immersion dans le milieu biologique. Alors que la configuration *cœur riche en Si / couche Ca-P*, typique des verres bioactifs conventionnels est logiquement visible pour le verre B75, les répartitions en silicium et calcium sont homogènes dans le verre mésostructuré. Le phosphore provenant du milieu biologique s'incorpore non pas en surface, mais dans le volume du grain, contrairement au verre sol-gel conventionnel.

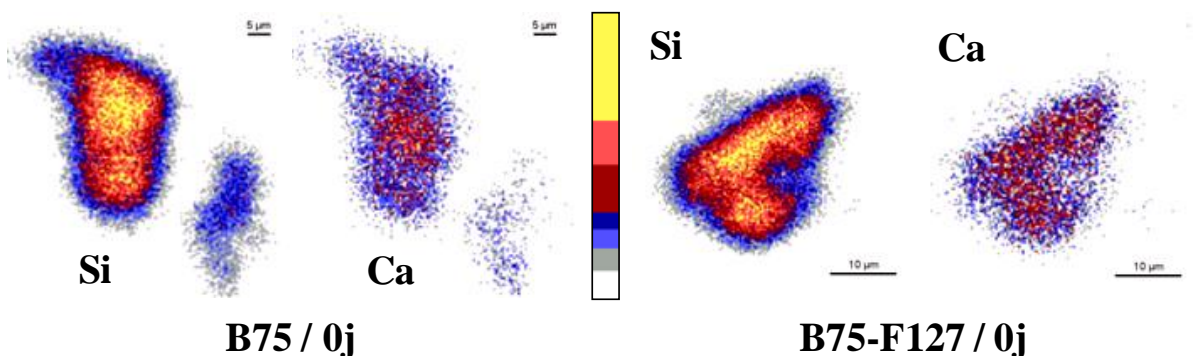


Figure 10-1 : Distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans des grains de verres B75 et B75-F127, avant interaction avec le milieu biologique.

Après 2 jours d'interaction, les images démontrent une persistance de la matrice silicée pour les deux verres binaires (Figure 10-3). Cependant, contrairement au verre B75, calcium et phosphore sont toujours présents au sein du matériau mésostructuré.

Les verres ternaires conservent quant-à-eux une répartition élémentaire homogène au bout d'une heure tant pour le verre sol-gel conventionnel, que pour le mésostructuré (Figure 10-5). Les comportements des deux matériaux se différencient néanmoins par la suite, puisque la discrimination cœur-couche valable pour le verre B67,5 ne l'est pas pour le verre B67,5-F127. Le verre mésostructuré semble en effet être composé essentiellement de calcium et de phosphore et la concentration en silicium semble très faible.

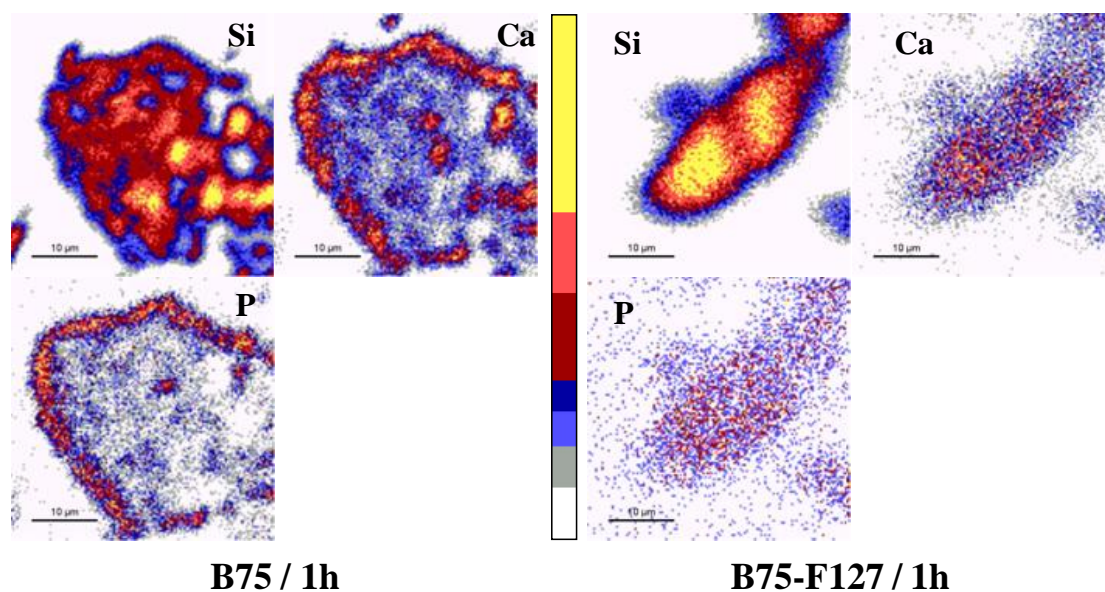


Figure 10-2 : Distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans des grains de verres B75 et B75-F127, après 1 heure d'interaction avec le milieu biologique.

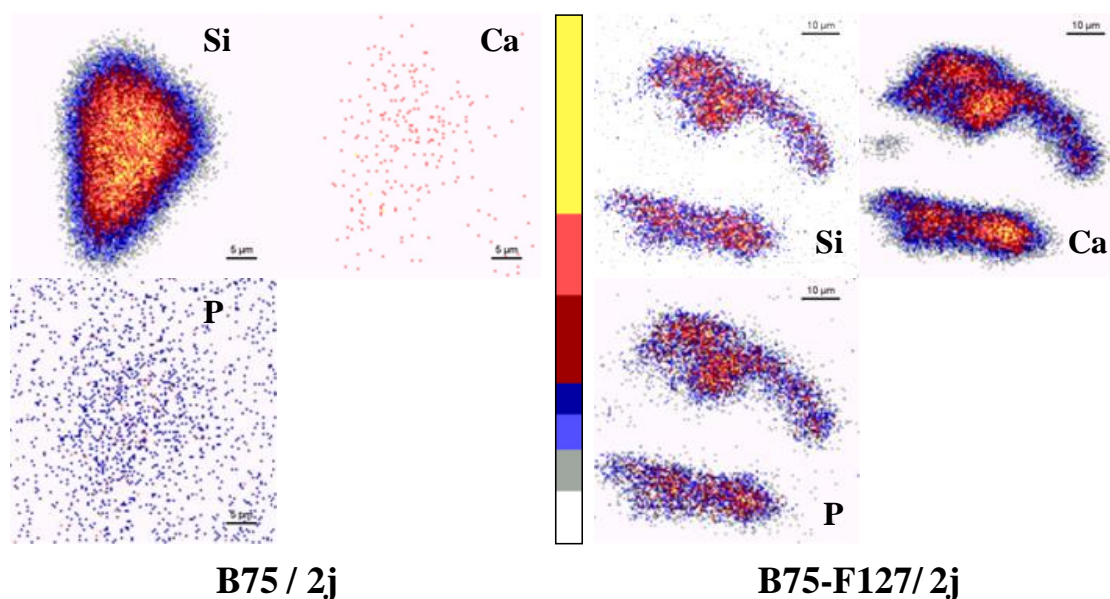


Figure 10-3 : Distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans des grains de verres B75 et B75-F127, après 2 jours d'interaction avec le milieu biologique.

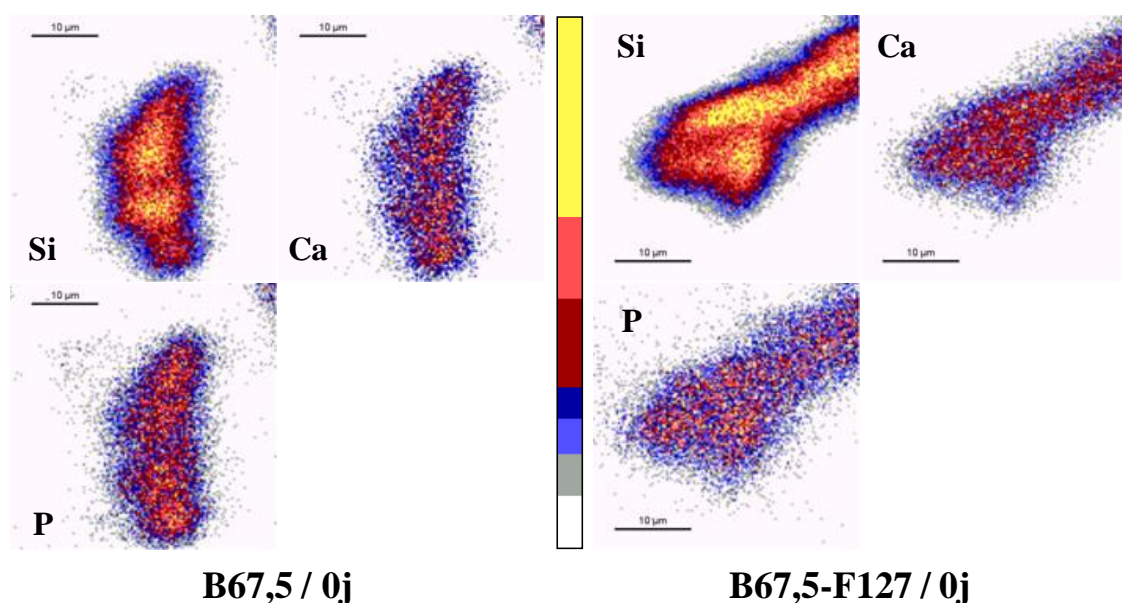


Figure 10-4 : Figure: Distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans des grains de verres B67,5 et B67,5-F127, avant interaction avec le milieu biologique.

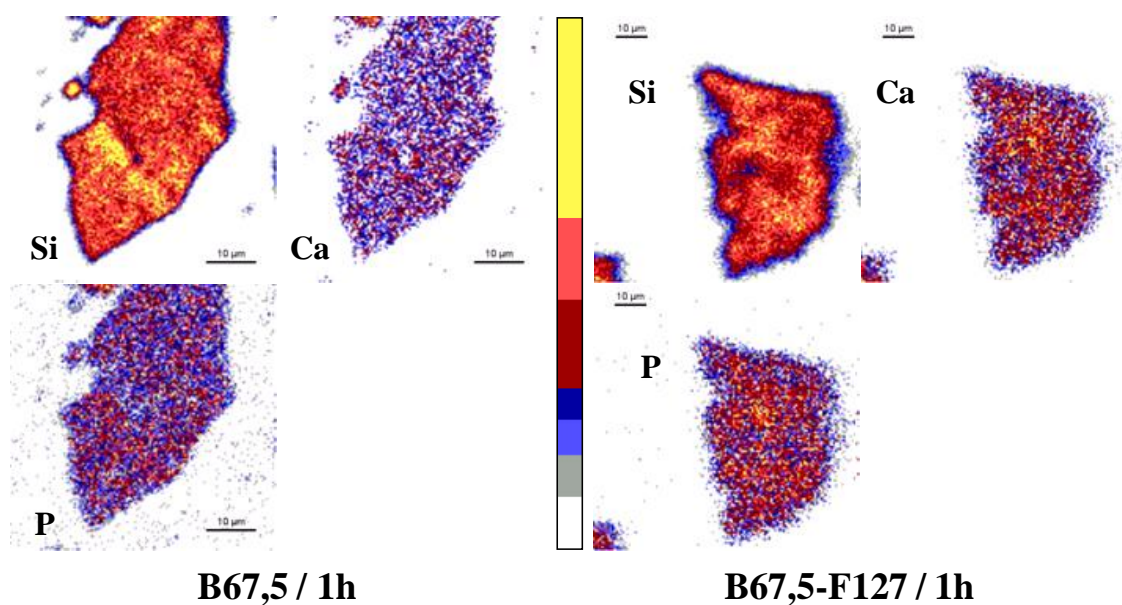


Figure 10-5 : Distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans des grains de verres B67,5 et B67,5-F127, après 1 heure d'interaction avec le milieu biologique.

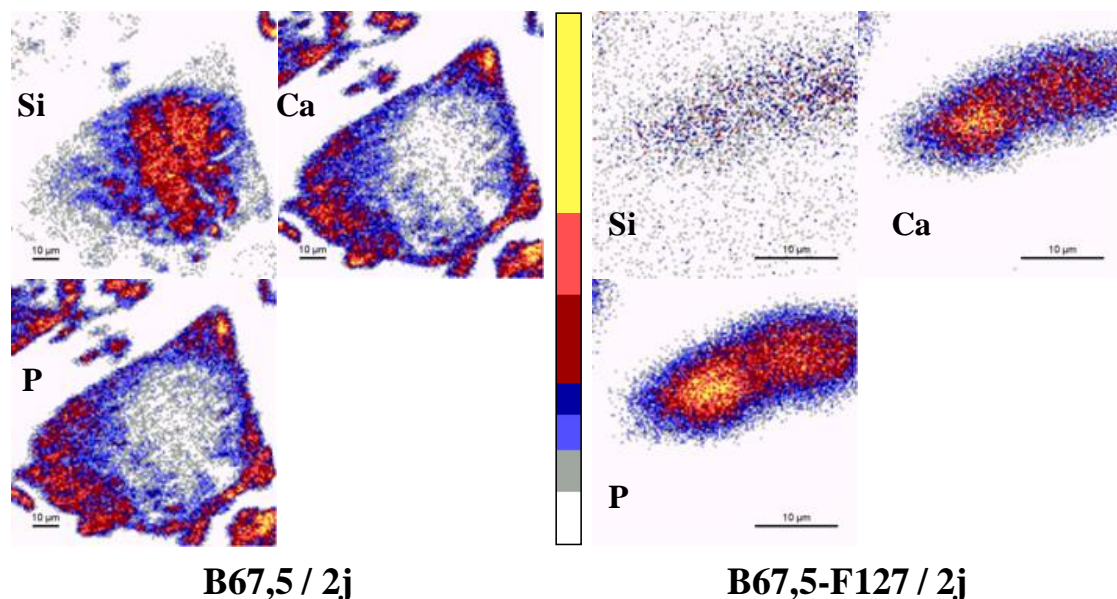


Figure 10-6 : Distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans des grains de verres B67,5 et B67,5-F127, après 2 jours d'interaction avec le milieu biologique.

10.2 Evolution des concentrations chimiques au sein des grains de verres

Nous avons vu que les cartographies chimiques des verres mésostructurés ne permettaient pas d'établir des régions d'intérêt. Cependant comme dans le cas des verres précédents, nous avons tenu à séparer la contribution de la périphérie du grain de celle de la zone intérieure. Or, il s'avère que pour ces deux régions l'évolution est la même que ce soit pour le verre binaire ou le verre ternaire.

10.2.1 Verre binaire

L'évolution globale des concentrations élémentaires du verre mésostructuré est comparée aux évolutions périphériques (Figure 10-7) et intérieures (Figure 10-8) du verre sol-gel conventionnel. L'évolution de l'interface du verre B75 a été décrite précédemment : formation d'une couche Ca-P entre 1 h et 6h traduite sur la même période par une augmentation conséquente des concentrations de calcium et de phosphore logiquement associée à une diminution du silicium. Par la suite, cette couche se dissout entraînant une chute des concentrations en Ca et P et une prédominance du Si. Le cœur du verre B75 subit en premier lieu un départ des ions Ca^{2+} et malgré une faible incorporation du phosphore (entre 0 et 1 jour) son principal composant reste le silicium.

Dans le cas du verre mésostructuré, la diminution du calcium entre 0 et 1 heure (effet opposé du silicium) est due à la désalcalinisation du réseau. La cinétique de ce processus est proche de celle du centre du grain de verre B75 (cf. évolution Ca et P, Figure 10-8). Par ailleurs, alors que le phosphate de calcium est formé uniquement en surface pour le verre B75, il occupe le volume total du grain de verre B75-F127 comme le démontrent les augmentations constantes en Ca et P (Figure 10-7). Ce phosphate de calcium paraît en outre plus stable ou du moins encore en formation car il ne se dissout pas, contrairement à la couche phosphocalcique du verre sol-gel conventionnel (baisse de Ca et P entre 6 heures et 2 jours). La dernière remarque concerne la décroissance marquée du silicium pour le matériau mésostructuré, alors que celle du cœur du verre B75 reste relativement stable. Ce phénomène ne signifie pas automatiquement une dissolution accrue du réseau de silice, mais peut traduire une diminution de sa contribution massique au profit de la phase phosphocalcique.

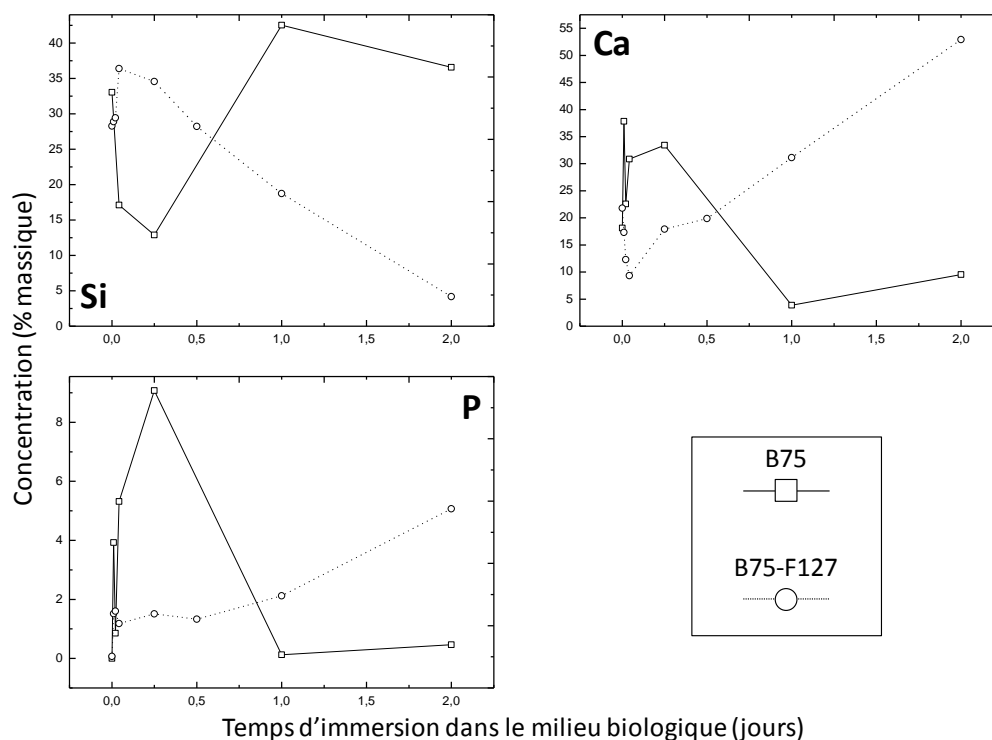


Figure 10-7 : Evolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans les grains de verre B75-F127 et en périphérie des grains de verre B75.

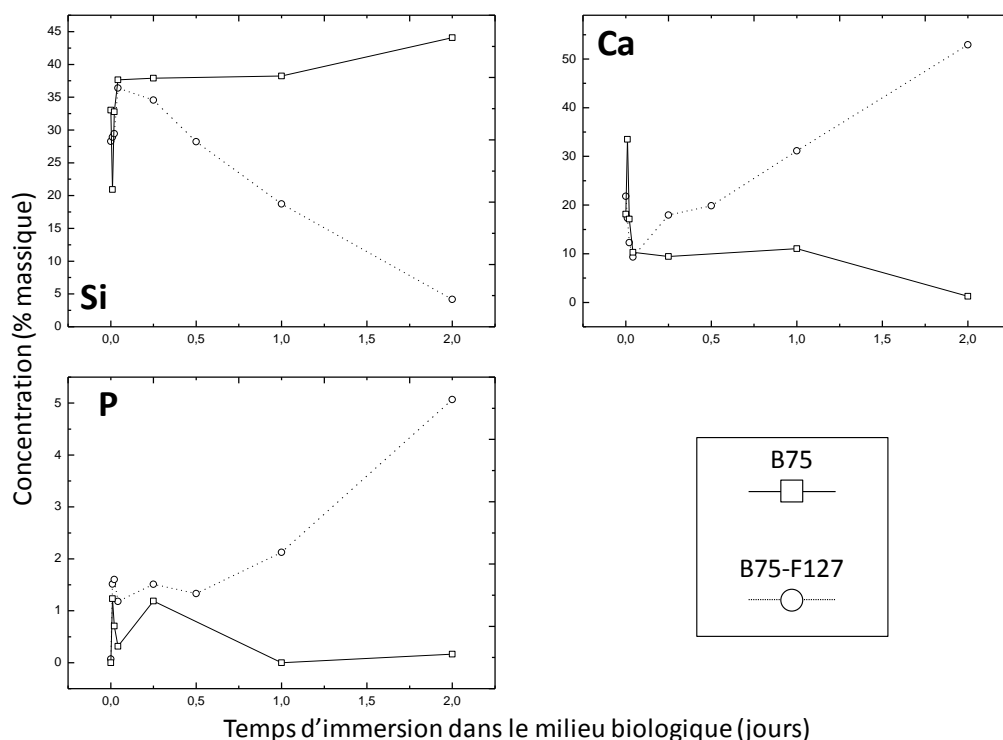


Figure 10-8 : Evolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans les grains de verre B75-F127 et dans la région intérieure des grains de verre B75.

10.2.2 Verre ternaire

Comme pour les verres binaires, l'idée est de comparer les évolutions globales du verre mésostructuré avec celles du matériau conventionnel. La Figure 10-9 présente les courbes, d'une part des mesures sur la totalité des grains de verre B67,5-F127 et d'autre part à la surface des grains de verre B67,5. La première observation qui s'impose est la similarité très marquée des deux courbes pour chacun des trois éléments. Dans les deux cas la diminution du calcium (respectivement l'augmentation du silicium), signe de la désalcalinisation du réseau, intervient entre 0 et 1 heure. Par la suite, les augmentations concomitantes du calcium et du phosphore peuvent être interprétées par la formation de précipités de phosphate de calcium au sein du grain pour le verre mésostructuré et en périphérie pour le verre conventionnel. Au vu de ces résultats, il est apparu que les phénomènes intervenant dans les deux cas sont de même nature (cinétique, intensité), le verre mésostructuré permettant pour sa part un processus en trois dimensions et non plus uniquement surfacique.

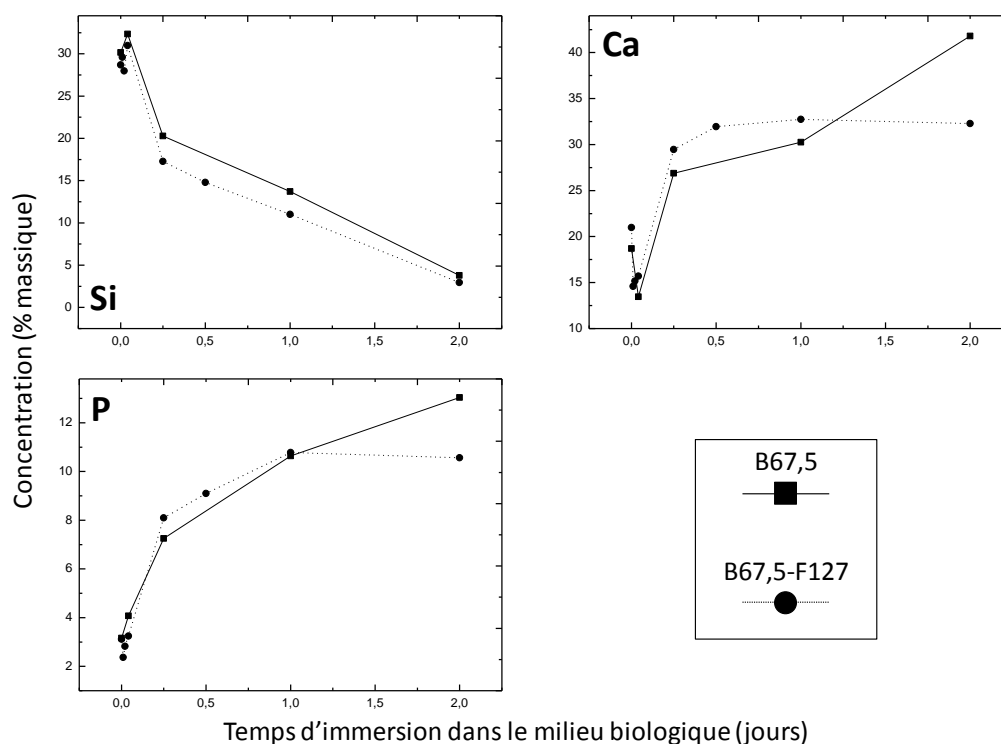


Figure 10-9 : Evolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans les grains de verre B67,5-F127 et en périphérie des grains de verre B67,5.

10.3 Evolution de la composition du milieu biologique

10.3.1 Verre binaire

Les courbes d'évolution élémentaires dans le milieu biologique (Figure 10-10) confirment certaines tendances esquissées par les mesures locales dans les grains. En premier lieu, les variations du calcium entre 0 et 1 heure accréditent la thèse de cinétiques de désalcalinisation très proches pour les deux matériaux. Après ce maximum, la concentration en calcium diminue beaucoup plus rapidement pour le verre B75 entre 1 heure et 2 jours. Il est à noter que l'amplitude et la cinétique de la décroissance de la courbe du phosphore sont elles aussi plus importantes pour le verre sol-gel conventionnel. Les courbes du silicium quasiment superposables permettent par ailleurs d'infirmer l'hypothèse d'une dissolution de la matrice vitreuse plus importante pour le verre B75-F127.

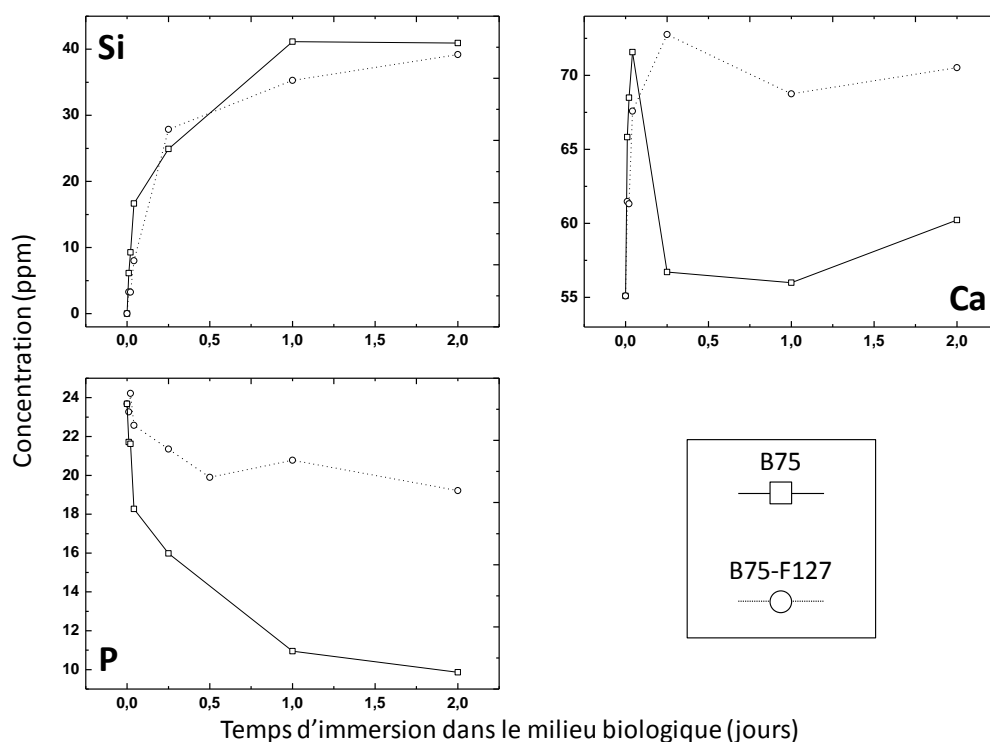


Figure 10-10 : Evolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les verres B75 et B75-F127.

10.3.2 Verre ternaire

Les variations de concentration du DMEM en silicium, calcium et phosphore sont présentées en Figure 10-11. De manière similaire au verre binaire, les évolutions identiques du silicium indiquent que les cinétiques et l'intensité de la dégradation de la matrice de silice sont très proches pour les deux verres. Le relargage du calcium suit lui aussi des cinétiques analogues (entre 0 et 1h pour le verre B67,5 et entre 0 et 6h pour le verre B67,5-F127), bien que la quantité de calcium libérée dans le milieu soit plus importante pour le verre mésostructuré. Cette différence peut potentiellement s'expliquer par une réactivité 'volumique' dans le cas du verre B67,5-F127. Enfin comme pour le verre binaire, la diminution de la concentration est beaucoup moins marquée pour le verre mésostructuré.

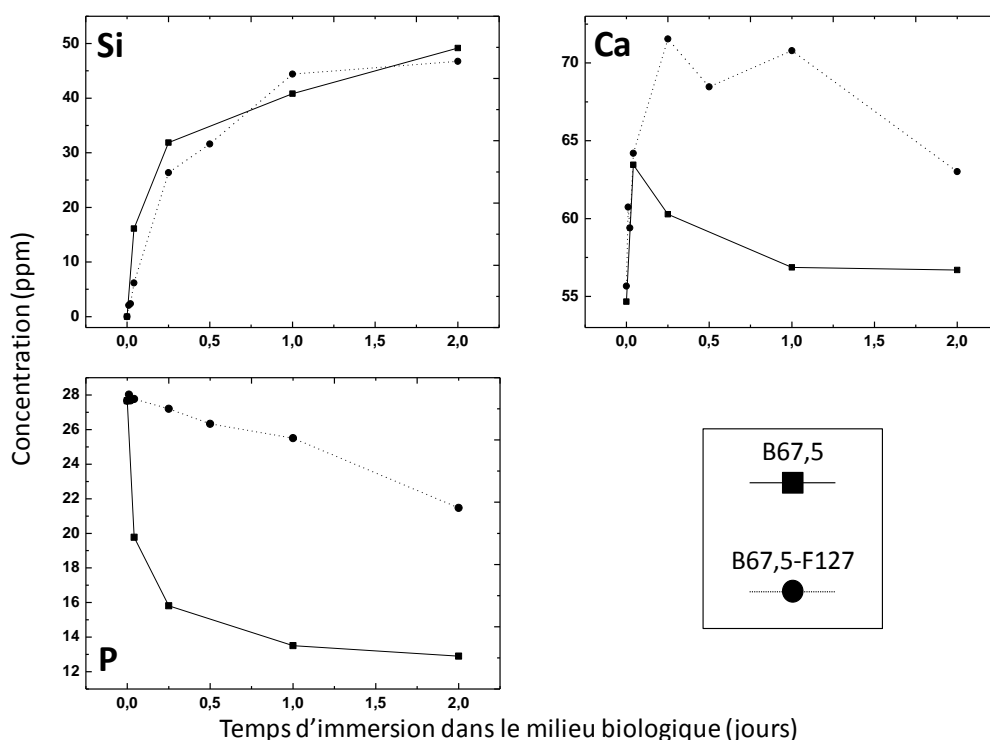


Figure 10-11 : Evolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les verres B67,5 et B67,5-F127.

10.4 Discussion

A l'issue des trois paragraphes différents, nous avons dégagé plusieurs tendances quant à la spécificité des processus intervenant au sein des verres mésostructurés, grâce d'une part aux mesures locales par faisceau d'ions et d'autre part aux évolutions élémentaires du milieu biologique. Toutes ces tendances convergent vers une explication commune. En effet, la structuration des verres *via* un tensioactif permet de multiplier la surface spécifique par un facteur quatre, grâce à une porosité nanométrique homogène et interconnectée. Cette large surface spécifique permet *in fine* une réactivité tridimensionnelle homogène que ce soit pour les phénomènes de désalcalinisation, dissolution du réseau silicate ou formation de phosphate de calcium.

Plusieurs éclaircissements sont néanmoins nécessaires : i) Comme pour les verres dopés, la question de la nature et de l'évolution temporelle de la phase se pose. ii) Pourquoi la formation de cette phase est-elle permise au sein du matériau et non pas limitée à l'interface comme pour les verres sol-gel conventionnels ?

10.4.1 Nature et évolution de la phase

La Figure 10-12 représente des clichés MEB des verres B75-F127 et B67,5-F127 avant et après 12 heures d'immersion dans le milieu biologique.

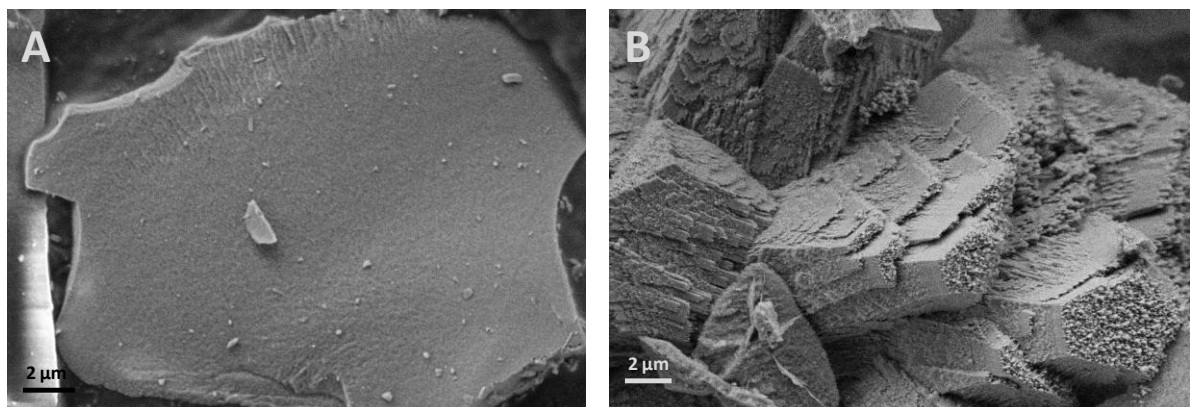


Figure 10-12 : Images MEB du verre B75-F127 avant (A) et après 6 heures d'immersion dans le milieu biologique (B).

Ces clichés démontrent clairement l'apparition d'une nouvelle phase, composée de calcium et de phosphore si l'on en croit les cartographies élémentaires réalisées par PIXE. Trois phases contenant calcium et phosphore peuvent majoritairement se former dans les liquides biologiques tel que le SBF ou le DMEM¹³⁴: les phosphates dicalciques, et octocalciques qui sont des phases métastables et l'hydroxyapatite qui est la phase la plus stable thermodynamiquement et donc la moins soluble (Tableau 10-1).

Nomenclature	Formule	Rapport Ca/P atomique
Phosphate dicalcique	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
Phosphate octocalcique	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$	1,66

Tableau 10-1 : Principales Phases cristallines Ca-P pouvant être formées dans le SBF ou le DMEM

L'évolution de la nature de la phase a été suivie *via* le rapport atomique Ca/P mesuré dans le grain pour les verres mésostructurés en surface pour les verres sol-gel conventionnels. Ces courbes sont présentées sur la Figure 10-13 pour les verres binaires et ternaires. On observe que pour les verres binaires, le rapport Ca/P connaît un minimum pour les deux matériaux après 1 heure d'interaction. Ces minima diffèrent toutefois en plusieurs points : il est plus bas (2,85 contre 5,7) pour le verre B75, mais il est aussi plus court car il est déjà proche de 23 après 6 heures du fait de la dissolution de la couche. Ce rapport très bas, ainsi que la dissolution de la phase sont des indices de la formation des phases métastables citées plus

haut. Ces dernières, bien que moins stable que l'apatite, ont une cinétique de précipitation favorisée¹³⁴. La réactivité de surface, via un relargage limité du calcium, permet uniquement la formation de ces phases pour lesquelles le rapport Ca/P est compris entre 1 et 1,5. Au contraire la réactivité tridimensionnelle du verre mésostructuré se traduit par relargage plus important de calcium dans le milieu. La précipitation de phases apatitiques ($\text{Ca/P}_{\text{at}} = 1,66$) est alors possible. Cette hypothèse tend à être confirmée par la stabilité accrue de la phase Ca-P dans le cas du verre B75-F127 (cf. cartographies chimiques et rapport Ca/P).

Il faut par ailleurs préciser que le rapport Ca/P relativement élevé (autour de 10) par rapport à l'apatite entre 12 heures et 2 jours, peut s'expliquer par la présence de phases riches en calcium et libres de phosphore amorphes ou cristallisées telles l'oxyde de calcium CaO, la Portlandite Ca(OH)_2 ou le carbonate de calcium CaCO_3 . La formation de ces phases peut s'expliquer par la combinaison d'un relargage massif et rapide de calcium dans le milieu biologique avec une source limitée de phosphore disponible.

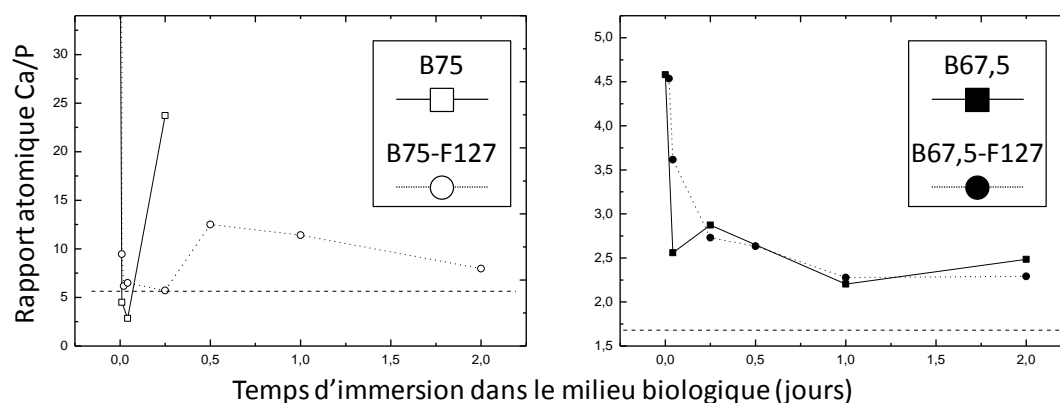


Figure 10-13 : Evolution des rapports atomiques Ca/P en surface des grains de verre B75 et B67,5 et dans les grains B75-F127 et B67,5-F127.

La problématique développée dans le cas du verre binaire, n'a pas lieu d'être pour le verre ternaire, car ce dernier contient initialement du phosphore. Les deux courbes présentées ont en effet une allure similaire : une décroissance exponentielle jusqu'à une valeur proche de 2,3 qui peut elle aussi être due à des phases riches en calcium.

10.4.2 Précipitation surfacique / volumique

Dans ce paragraphe, nous allons tenter de comprendre pourquoi la précipitation des phases Ca-P a lieu dans le volume pour les verres mésostructurés et en surface pour les verres

sol-gel conventionnels. Le premier élément essentiel à la précipitation tridimensionnelle est une interconnexion élevée nécessaire à la diffusion des éléments composant la phase néoformée. Si cette interconnexion idéale est conférée aux verres mésostructurés, elle ne l'est pas pour les verres conventionnels. En effet, bien que la voie sol-gel soit naturellement génératrice de mésoporosité, cette dernière reste peu connectée, comme l'attestent les différences observées entre les surfaces spécifiques, qui sont plus de quatre fois supérieures pour les matériaux synthétisés via des tensioactifs.

Le deuxième paramètre possédant une influence potentielle est le diamètre des pores. En effet, *Deng et al.*¹⁴⁸ ont décrit l'absence de précipitation d'hydroxyapatite à l'intérieur de matrices mésostructurées dont le diamètre des pores est égal à 1,4 nm. Ils tentent donc dans cette étude de comprendre ce phénomène grâce aux mécanismes de nucléation. Commençons par quelques rappels sur la notion de nucléation.

La nucléation correspond à la formation d'un germe ou nucléus. Elle peut être homogène si elle se produit de manière aléatoire dans la solution ou hétérogène si elle se produit sur un centre nucléant qui peut être une surface.

Nucléation homogène

Dans le cas d'un nucléus sphérique de rayon r , la variation d'enthalpie libre associée à la nucléation homogène s'exprime ainsi :

$$\Delta G_{\text{hom}} = \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma \quad (1)$$

Le premier terme concerne **l'enthalpie libre volumique**. ΔG_v est la différence des enthalpies libres par unité de volume des phases solides et liquides : $\Delta G_v = g_s - g_l < 0$. Cette contribution volumique est donc favorisée énergétiquement. Le deuxième terme est une **enthalpie libre surfacique**, liée à la création d'une interface entre les phases solide et liquide, avec γ l'énergie libre par unité d'aire. Ce terme est lui positif.

Pour de faibles valeurs de r , le terme de surface domine et $\Delta G_{\text{hom}} > 0$. Le germe est donc instable et se redissout. Pour de plus grandes valeurs de r , le terme volumique domine et $\Delta G_{\text{hom}} < 0$. Le germe est thermodynamiquement stable et subsiste dans le temps. Le rayon des

germes doit donc se situer au-delà rayon critique r^* , qui peut être calculé en dérivant l'équation (1) par rapport à r :

$$r^* = \frac{2\gamma}{\Delta G_v} \quad (2)$$

Nucléation hétérogène

Si l'on considère que le germe se apparaît à la surface d'un substrat (Figure 10-14), la forme du germe n'est plus une sphère, mais une 'calotte sphérique' de rayon r . L'angle de contact θ entre le germe et le substrat dépend des propriétés de surface entre le liquide, le germe solide et le substrat.

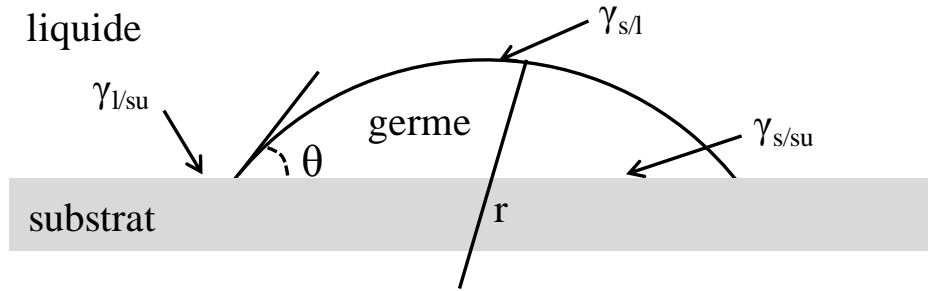


Figure 10-14 : Formation d'un germe à la surface d'un substrat.

Contrairement à la nucléation homogène, trois interfaces interviennent ici : l'interface solide-liquide de surface $S_{s/l}$ et d'énergie interfaciale $\gamma_{s/l}$, l'interface solide-substrat d'énergie interfaciale $\gamma_{s/su}$, et l'interface liquide-substrat d'énergie interfaciale $\gamma_{l/su}$. Si l'on considère que V est le volume de la calotte sphérique, la variation d'enthalpie libre s'exprime alors :

$$\Delta G_{het} = V \cdot \Delta G_v + S_{s/l} \gamma_{s/l} + S_{s/su} (\gamma_{l/su} + \gamma_{s/su}) \quad (3)$$

Par ailleurs le volume de la calotte (4), ainsi que les surfaces extérieures (5) et de la base (6) sont connues :

$$V = \frac{\pi}{3} r^3 (2 - 3 \cos \theta + \cos^3 \theta) \quad (4)$$

$$S_{ext} = 2\pi r^2 (1 - \cos \theta) \quad (5)$$

$$S_{base} = \pi(r \sin \theta)^2 \quad (6)$$

Après simplifications, la variation d'enthalpie libre pour une nucléation hétérogène s'exprime donc :

$$\Delta G_{het} = \left(\frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v + 4 \pi r^2 \gamma_{s/l} \right) \cdot f(\theta) \quad (7)$$

Avec

$$f(\theta) = \frac{1}{4} (2 - 3 \cos \theta + \cos^3 \theta) \quad (8)$$

La variation d'enthalpie libre de la nucléation hétérogène est donc très similaire à la nucléation homogène :

$$\Delta G_{het} = \Delta G_{hom} \cdot f(\theta) \quad (9)$$

Dans la majorité des cas, $f(\theta)$ est inférieur à 1, la nucléation hétérogène sera énergétiquement favorisée comparativement à l'homogène. Considérons une symétrie donnée pour le substrat, des pores cylindriques dans notre cas. Si cette symétrie reste fixée, l'angle de contact θ ne varie pas et par suite, $f(\theta)$ non plus. En dérivant ΔG_{het} , il apparaît que la valeur maximale que peut prendre r et correspondant au rayon critique r^* est la même que dans le cas d'une nucléation homogène. Le rayon critique de la nucléation hétérogène de l'hydroxyapatite peut donc en théorie être calculé à partir de l'équation (2). Des simulations numériques sur la sursaturation de l'hydroxyapatite démontrent que le rayon critique r^* se situe entre 0,4 et 4 nm^{132, 134}.

La nucléation d'apatite dans des pores inférieurs à au rayon critique n'est pas possible car les germes formés ne seront pas stables thermodynamiquement. Au contraire, au-delà de ce rayon, la nucléation, puis la croissance peuvent avoir lieu. Le rayon modal de pore de nos verres mésostructurés est de l'ordre de 2,1 nm pour le verre B75-F127 et 1,9 nm pour le verre B67,5-F127. Ces valeurs se situent dans l'intervalle théorique

Les conditions sur le diamètre et l'interconnexion de la porosité d'un matériau, qui sont impératives à la cristallisation d'une phase au sein de celui-ci sont donc réunies pour nos verres mésostructurés, ce qui est cohérent avec nos observations.

Bilan des interactions physico-chimiques pour les verres mésostructurés :

- *Le processus physico-chimique se décompose en trois étapes chronologiques: relargage du calcium, dissolution de la matrice vitreuse, précipitation de phases phosphocalciques.*
 - *Contrairement aux verres conventionnels, ces phénomènes ont lieu dans le volume du grain et ne sont pas limités à la surface.*
 - *Alors que dans le cas du verre ternaire, les phases phosphocalciques semblent majoritaires, le verre binaire induit en outre la formation de phases calciques, du fait du relargage massif de calcium, combiné à une source de phosphore limitée.*
 - *Pour les verres ternaires, les cinétiques et les amplitudes des évolutions élémentaires et structurales du volume du grain mésostructuré sont très proches de celles de la surface du grain de verre sol-gel conventionnel. On est donc passé d'une réactivité surfacique à une réactivité tridimensionnelle.*
 - *La réactivité tridimensionnelle de ces verres mésostructurés est conditionnée par deux critères : un critère d'interconnexion et un critère de rayon limite des pores. ces deux critères sont observés par nos verres mésostructurés.*
-

Chapitre 11 Verres binaires et ternaires macrostructurés

11.1 Cartographies chimiques

De manière similaire aux matériaux mésostructurés, aucune couche n'apparaît lors de l'interaction des verres macroporeux avec le milieu biologique.

Les cartographies du verre B75-800, représentatives des verres binaires, sont présentées en Figure 11-1. Les éléments silicium et calcium sont répartis de manière homogène au sein du grain. Le phosphore issu du DMEM s'intègre dans le grain dès 15 minutes, puis reste dans le matériau sans discrimination spatiale.

Les trois verres ternaires évoluent eux aussi de manière similaire. Leurs images chimiques suggèrent qu'en apparence ils n'évoluent pas spatialement. Les cartographies du verre B67,5-800 (Figure 11-2) illustrent cette affirmation.

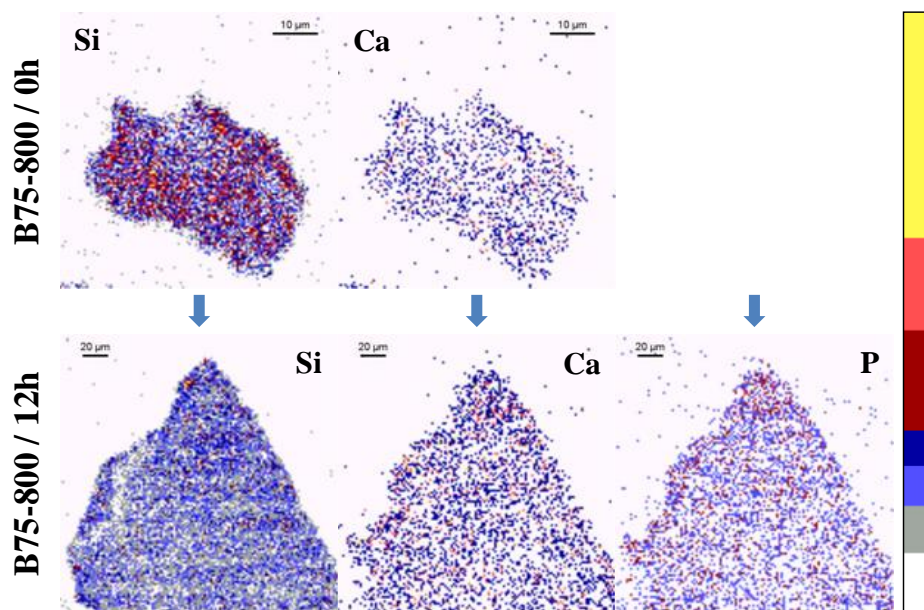


Figure 11-1 : Distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans les grains de verres B75-800, avant interaction et après 12h d'interaction avec le milieu biologique.

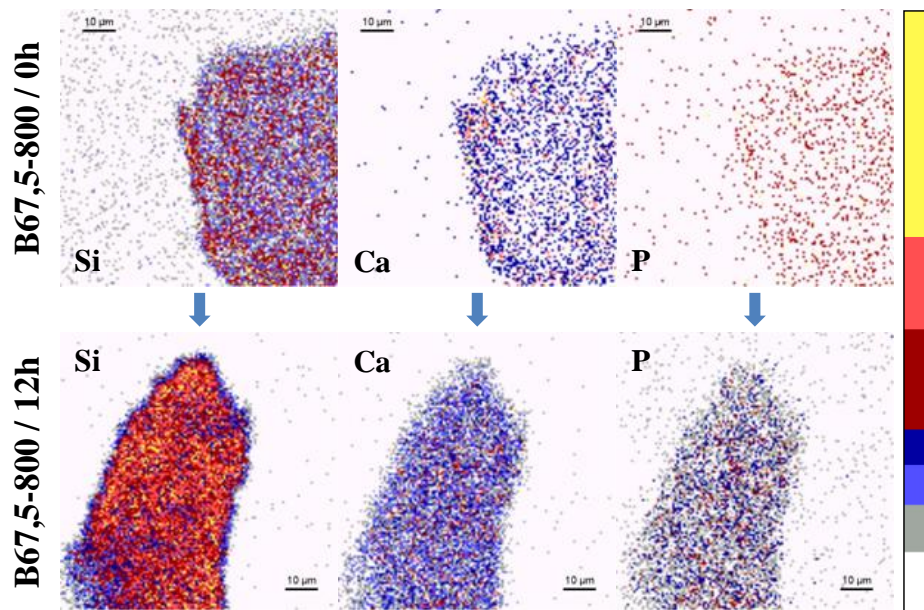


Figure 11-2 : Distribution des éléments silicium, calcium et phosphore dans les grains de verres B67,5-800, avant interaction et après 12h d'interaction avec le milieu biologique.

11.2 Evolution des concentrations chimiques au sein des grains de verres

Les mesures de concentrations locales au sein des grains de verre macroporeux sont corrélées aux cartographies chimiques. En effet, à l'instar des verres mésoporeux, la répartition des éléments reste spatialement homogène au cours du temps. Les résultats présentés tant pour les verres binaires que ternaires sont donc des mesures globales sur l'ensemble du grain.

11.2.1 Verres binaires

L'évolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore pour les verres macrostructurés binaires est illustrée par la Figure 11-3. Trois tendances générales apparaissent quelque soit l'élément considéré :

- i) Les évolutions se décomposent clairement en plusieurs étapes,
- ii) La taille des pores n'influe pas sur la cinétique d'apparition de ces processus,
- iii) Elle influe en revanche sur leur intensité.

Si l'on s'intéresse plus particulièrement au silicium, on remarque que sa concentration augmente jusqu'à 1 heure pour les trois verres, alors que dans le même délai la concentration en calcium diminue fortement. Comme nous l'avons vu auparavant, et spécialement pour le verre binaire, ces évolutions inverses sont le signe de la désalcalinisation du verre. Lors de la deuxième étape, le pourcentage de silicium décroît pour atteindre un minimum après 6 heures d'interaction, alors que les concentrations du calcium et du phosphore croissent jusqu'à un maximum après la même durée. Cette deuxième étape correspond à la précipitation de phosphates de calcium au sein du grain. Enfin la troisième et dernière étape voit les quantités de calcium et phosphore diminuer au profit du silicium, ce qui traduit, en accord avec les résultats précédents, une dissolution des phosphates de calcium métastable. Lors de ces deux dernières étapes, pendant lesquelles une phase phosphocalcique est présente dans le grain, il est important de remarquer que les concentrations en calcium sont directement corrélées avec la taille des pores : elles sont en effet plus importantes lorsque le diamètre des pores augmente. L'effet inverse est observé pour le silicium. Une phase riche en calcium semble donc prédominante dans les grains dont le diamètre est important, au détriment du réseau silicate initial. Les courbes du phosphore sont quant à elles ordonnées de manière inverse à celles du calcium. Nous reviendrons sur ce phénomène dans la discussion. Enfin les concentrations en calcium et en phosphore diminuent pour les 3 verres, ce qui est accompagné d'un effet opposé pour le silicium, signe de la dissolution des phases phosphocalciques.

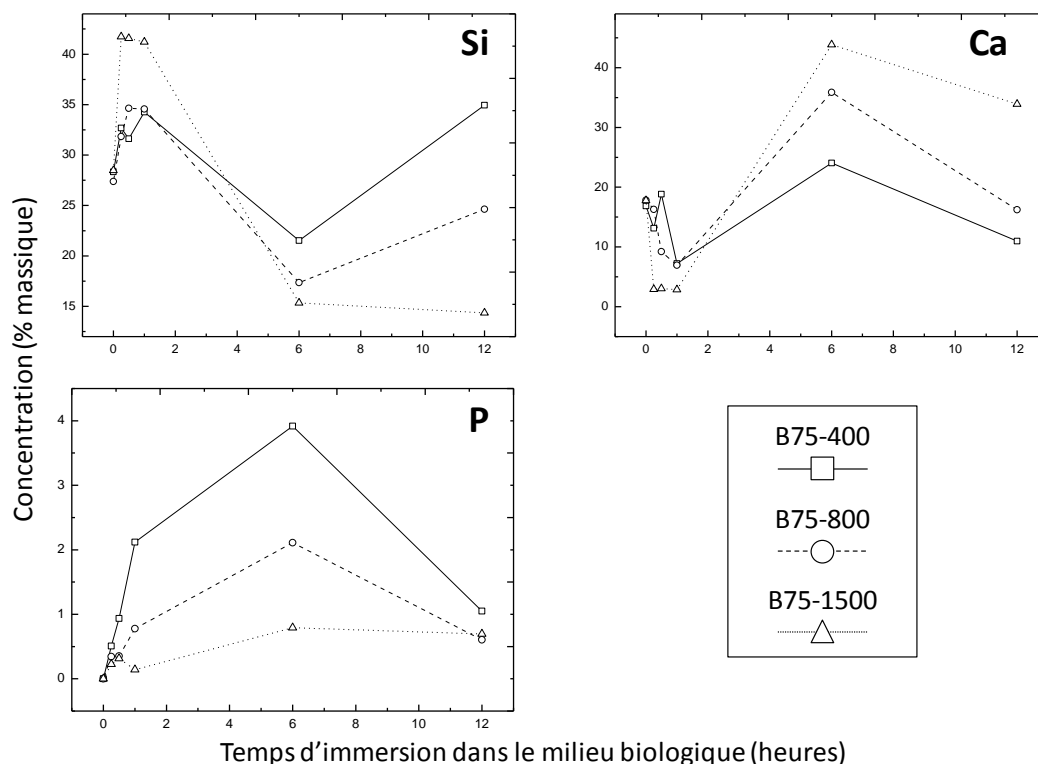


Figure 11-3 : Evolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans les grains de verre B75-400, B75-800 et B75-1500.

11.2.2 Verres ternaires

Les remarques générales concernant les verres binaires sont aussi valables pour les verres ternaires macrostructurés, car de fait les cinétiques ne semblent pas liées aux diamètres des pores, alors que ces derniers influent clairement sur l'intensité des variations des concentrations.

La Figure 11-4 présente les évolutions élémentaires des verres B67,5-400 ; B67,5-800 ; B67,5-1500. Comme pour les verres binaires, la désalcalinisation intervient entre 0 et 1 heure. Elle est cependant moins importante pour les verres binaires du fait de leur plus grande stabilité.

Après 1 heure d'interaction, la formation de phosphates de calcium dans le grain est démontrée par les augmentations concomitantes des concentrations en phosphore et calcium accompagnées de la décroissance du silicium. Un ralentissement de ce phénomène semble intervenir après 6 heures, indiqué par un infléchissement des courbes du silicium et du calcium, et une stagnation de celles du phosphore. Les concentrations élémentaires sont ici

aussi corrélées aux diamètres des pores, puisque les pourcentages en calcium et phosphore sont les plus importants pour le verre B67,5-1500 et les plus faibles pour le verre B67,5-400.

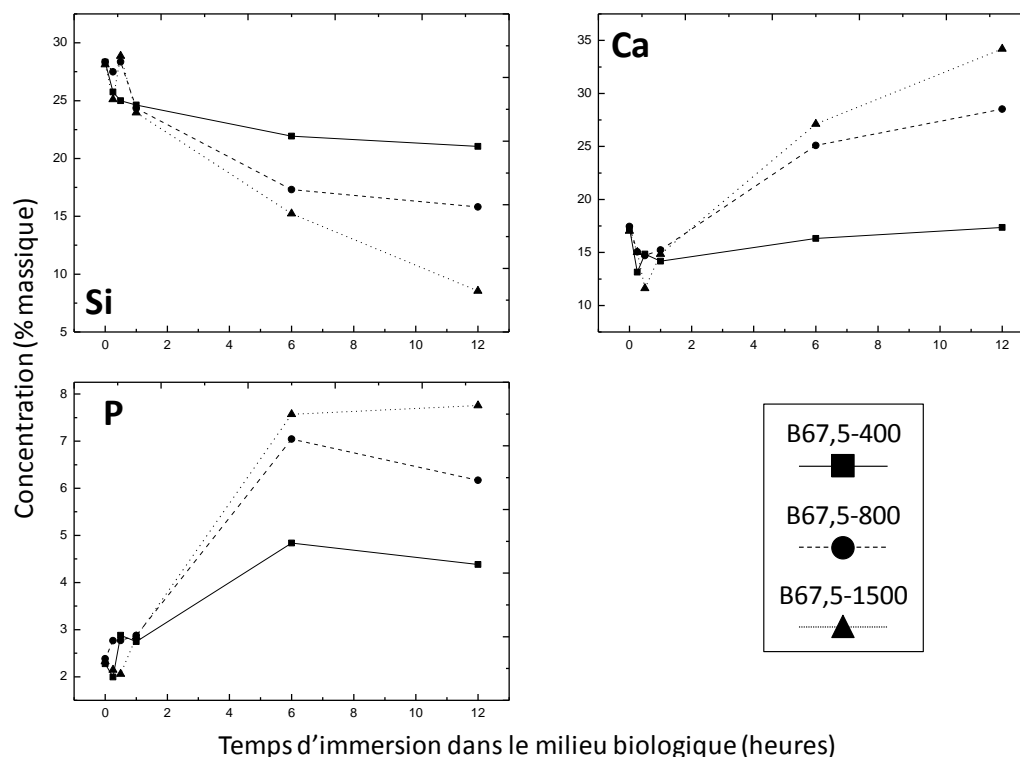


Figure 11-4 : Evolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans les grains de verre B67,5-400 ; B67,5-800 et B67,5-1500.

11.3 Evolution de la composition du milieu biologique

11.3.1 Verres binaires

Les évolutions élémentaires du milieu biologique sont à l'image des concentrations mesurées dans les grains. Elles établissent une dépendance claire entre le diamètre des pores et les variations des concentrations d'éléments dans le DMEM. L'évolution des concentrations Si, Ca, P pour les verres binaires sont présentées sur la Figure 11-5. La quantité de silicium dans le milieu augmente progressivement au cours du temps, du fait de la dissolution du réseau vitreux. Le phénomène semble plus important pour B75-1500. En ce qui concerne le calcium, sa concentration croît continuellement jusqu'à 6 heures, puis connaît un palier (voire une diminution pour le verre B75-1500) jusqu'à 12 heures. Contrairement à ce

qui pouvait être attendu, au vu de l'évolution du silicium, la quantité de calcium est plus importante pour le verre B75-400. Nous reviendrons sur ce point lors de la discussion. Les courbes du phosphore sont en revanche conformes à celles du silicium, puisque l'échange entre le matériau et le milieu est aussi favorisé pour le verre dont le diamètre de pore est le plus important (B75-1500).

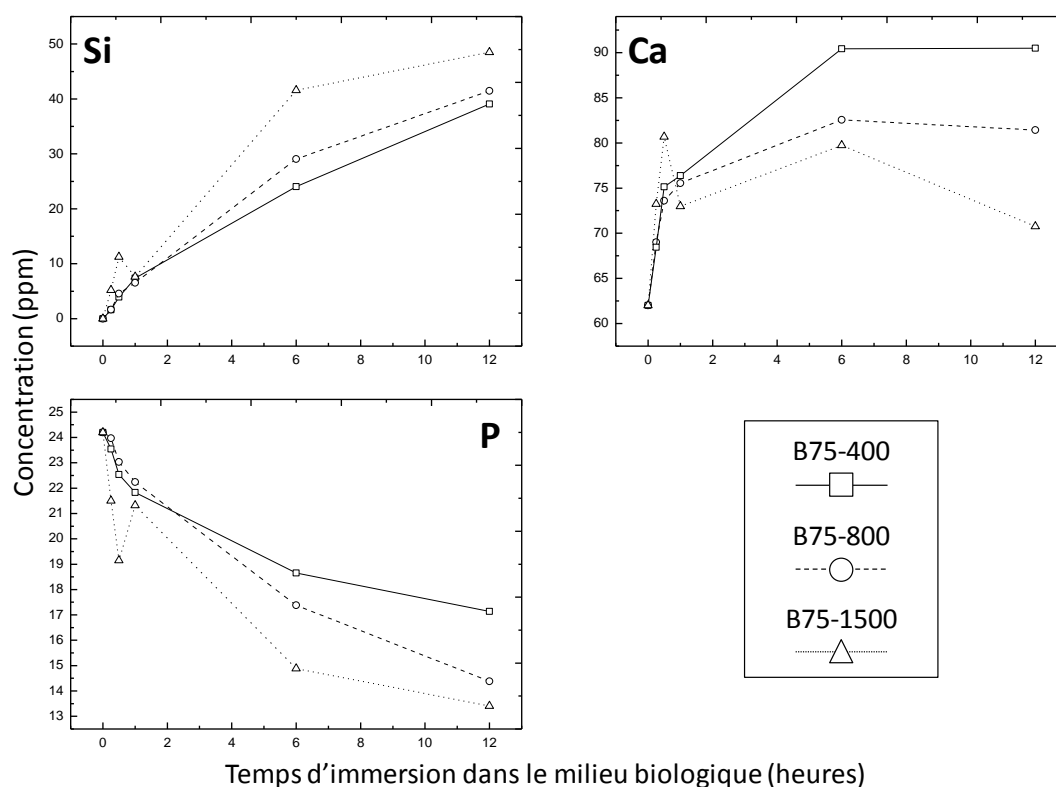


Figure 11-5 : Evolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les verres B75-400, B75-800 et B75-1500.

11.3.2 Verres ternaires

Les évolutions des concentrations du milieu en silicium et phosphore lors de l'immersion des verres ternaires dans le DMEM (Figure 11-6) sont très similaires à celle des verres binaires : un accroissement pour le silicium et une décroissance pour le phosphore, ces phénomènes étant amplifiés lorsque le diamètre des pores augmente. Contrairement à ce qui se passe pour les verres binaires, la quantité de calcium relarguée dans le milieu suit la même tendance que le silicium et le phosphore : elle est donc supérieure pour le verre B67,5-1500. Pour les trois verres, la concentration en calcium s'élève rapidement jusqu'à 1 heure, puis un plateau est atteint (ou du moins un ralentissement) entre 1 heure et 12 heures.

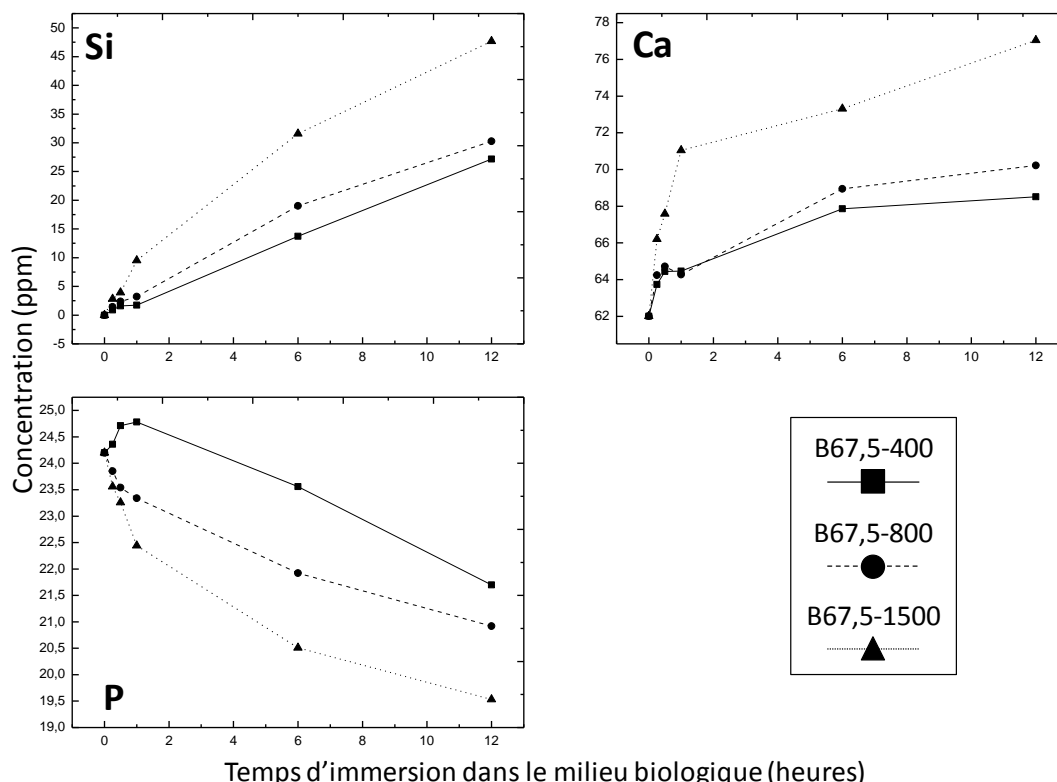


Figure 11-6 : Evolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans le milieu biologique en fonction du temps d'interaction avec les verres B67,5-400 ; B67,5-800 et B67,5-1500.

11.4 Discussion

Les résultats obtenus au précédemment, prouvent que qu'il existe un lien direct entre le diamètre de la macroporosité des verres et les processus physico-chimiques intervenant pendant leur immersion dans le milieu biologique. La corrélation de ces résultats pour bâtir une hypothèse n'est cependant pas simple. Des éléments de réponse peuvent être apportés en considérant les facteurs susceptibles d'agir sur ces processus. La composition étant la même pour une catégorie de verre (binaires et ternaires), ces facteurs décrits au Chapitre 5 sont :

- i) La surface spécifique, qui augmente de manière inverse au diamètre des macropores,
- ii) Le volume macroporeux, qui augmente avec le diamètre des macropores,

Ces bases étant posées, on peut tenter d'expliquer les phénomènes observés. Une des premières questions qui se posent, concerne le pourcentage accru de la phase phosphocalcique dans le grain pour les verres dont le diamètre est le plus grand (Figures 11-3 et 11-4). Si dans un premier temps la précipitation d'une phase est un phénomène surfacique (Figure 11-7),

cette première hypothèse n'est pas valable : d'une part car la tendance observée est inverse (la surface spécifique étant supérieure pour les verres constitués de petits macropores, les concentrations en Ca et P devraient donc être supérieures pour ces derniers) ; d'autre part car la précipitation devient un phénomène volumique (Figure 11-7). Comme reprécisé ci-dessus, les résultats du Chapitre 5 démontrent que le volume macroporeux augmente lorsque le diamètre des pores augmente. Un volume macroporeux supérieur signifie donc *in fine* un volume de précipité supérieur pour les verres dont les diamètres de pores sont les plus grands. Les ratios du volume de la phase Ca-P sur le volume de la matrice silicate (V_{Ca-P}/V_{Si}) sont donc plus importants pour les verres '1500' que pour les verres '800' et *a fortiori* des '400'. Si l'on suppose que la densité de chacune de ces deux phases est constante pour une catégorie de verre donnée (binaire ou ternaire), les rapports massiques seront eux aussi plus hauts, ce qui est en adéquation avec nos résultats.

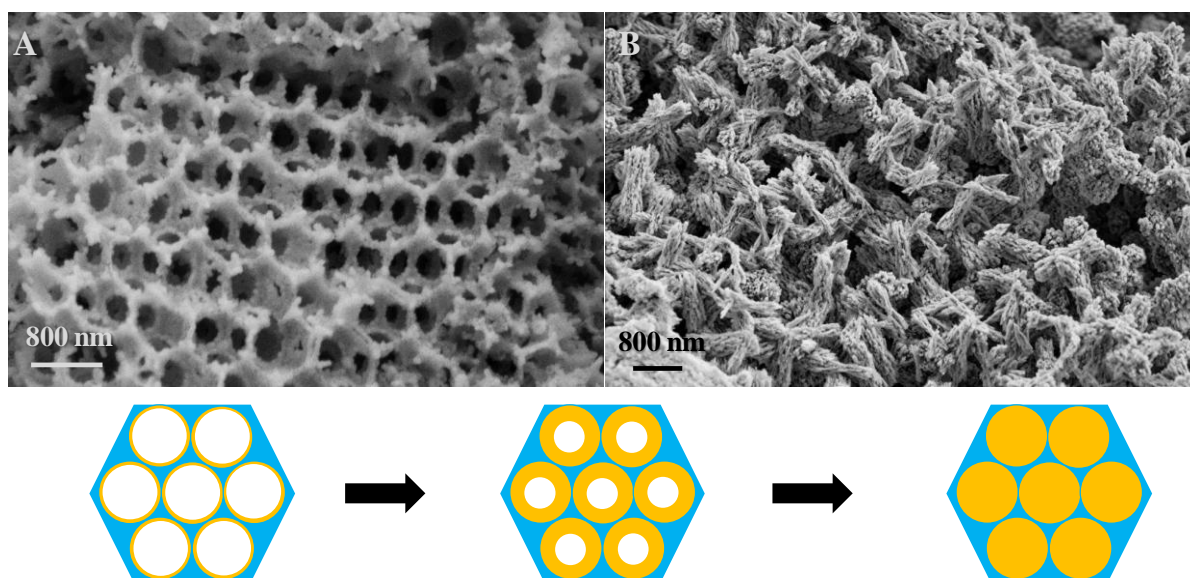


Figure 11-7 : Images MEB du verre B75-800 après 1 heure (A) et 12 heures d'immersion dans le milieu biologique (B).

La deuxième interrogation que suscitent nos résultats, porte sur le relargage accru du silicium, et du calcium pour le verre ternaire '1500' par rapport aux verres '800' et '400' (Figure 11-6). Ces données peuvent paraître paradoxales, car la désalcalinisation et la dissolution du réseau sont favorisées par une grande surface spécifique, or cette dernière est plus élevée pour le verre B67,5-400 que pour les verres B67,5-1500.

Une explication possible serait de considérer que pour une même composition chimique des murs qui se dissolvent, les gradients de concentration au sein d'un macropore seront d'autant

plus grands que le diamètre du macropore sera important. La dissolution des systèmes ayant les plus gros macropores sera donc exaltée, bien que ces derniers possèdent une surface spécifique plus faible

Le troisième et dernier point à éclaircir est l'inversion des tendances dans le relargage du calcium entre les verres binaires et ternaires. On a vu dans le paragraphe précédent que ce relargage était favorisé pour les plus grands pores, du fait d'un diamètre d'interconnexion plus large. Cette hypothèse s'appliquant aux verres ternaires, pourquoi n'est-ce pas le cas des verres binaires ? La réponse tient à la nature de la phase formée dans les pores. Les résultats des verres mésoporeux binaires nous ont montré qu'une importante surface spécifique permet un relargage massif de calcium associée à une source de phosphore limitée conduit préférentiellement à la formation de phases calciques au détriment des phosphates de calcium métastables formés pour les verres conventionnels. Le volume macroporeux étant supérieur pour les verres '1500', pour une même quantité de phosphore issu du milieu, sa concentration dans les phases néoformées sera plus faible que dans les verres '400' (courbes du phosphore, Figure 11-3). La proportion (phase Ca) / (phase Ca-P métastable) semble logiquement plus importante dans les verres à grande porosité. La dissolution des phosphates de calcium se traduira donc par un relargage plus important pour les verres de taille de pore plus faible. Cette hypothèse est confirmée par l'évolution du rapport atomique Ca/P au cours du temps pour le verre binaire (Figure 11-Après 1 heure d'interaction, ce dernier est beaucoup plus élevé pour le verre B75-1500 que pour les verres B75-800 et B75-400. En ce qui concerne les verres ternaires, les évolutions de ces rapports sont très proches suggérant des phases formées similaires.

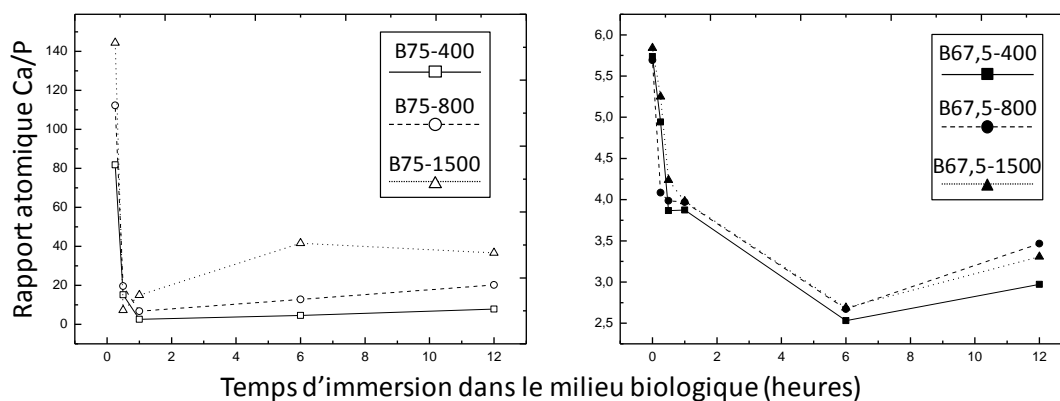


Figure 11-8 : Evolution des rapports atomiques Ca/P dans les grains B75-400 ; B75-800 ; B75-1500 ; B67,5-400 ; B67,5-800 et B67,5-1500.

Bilan des interactions physico-chimiques pour les verres macrostructurés :

- *Le processus physico-chimique se décompose comme pour les autres verres en trois étapes chronologiques: relargage du calcium, dissolution de la matrice vitreuse, précipitation de phases phosphocalciques.*
 - *De manière similaire aux verres mésostructurés, ces réactions ont lieu dans le volume du grain. Les verres binaires macrostructurés induisent eux aussi la formation d'une part importante de phases calciques.*
 - *Le pourcentage de phases calciques ou phosphocalciques dans la composition totale du verre, augmente lorsque le diamètre des pores augmente. Ce phénomène s'explique par une augmentation du volume poreux des verres, et donc une augmentation du volume accessible à la précipitation de ces phases.*
 - *la dissolution accrue des verres dont la taille de pore est grande, est contrôlée par le diamètre de l'interconnexion. En effet, plus ce diamètre est réduit, et plus la diffusion sera ralentie par la précipitation des phases calciques ou phosphocalciques.*
-

Conclusions et perspectives

La recherche sur les substituts osseux est un domaine en pleine expansion, à la confluence de plusieurs disciplines scientifiques. Un des enjeux actuels est la mise au point d'une nouvelle génération de matériaux qui, outre leur rôle de comblement, permettent une réponse 'd'auto-guérison' de l'organisme. Cette réponse est étroitement liée à celles des cellules qui peuvent être stimulées par un relargage local d'ions minéraux (Si, Ca, Mg), de molécules ou de protéines provenant d'un biomatériau implanté. Cependant ces nouveaux défis nécessitent d'une part une bonne maîtrise des propriétés des matrices au sein desquelles sont 'stockées' les espèces délivrées, et d'autre part une connaissance poussée des réactions physico-chimiques intervenant entre ces matériaux et le milieu biologique.

Dans ce but nous avons dans un premier temps élaboré des verres bioactifs dans des systèmes binaires et ternaires aux propriétés diverses. Des verres dopés ont été synthétisés par la voie sol-gel, leurs conférant ainsi une homogénéité chimique. L'utilisation de tensioactifs, en l'occurrence non-ioniques, nous a permis d'obtenir des verres poly-oxydes mésostructurés. Enfin, grâce à des méthodes d'opale inverse basées sur l'utilisation de billes de polystyrène, des verres à macroporosité organisée ont été fabriqués.

L'étape suivante de notre démarche a consisté à réaliser les essais *in vitro* nécessaires à l'évaluation de la bioactivité lors des interactions verre/milieu biologique. Les protocoles expérimentaux développés à cette occasion se sont révélés fructueux : ils ont permis au final la réalisation de coupes transverses ultrafines de nos verres, autorisant ainsi la cartographie élémentaires de ces derniers.

L'étude approfondie des résultats obtenues par micro-PIXE nous a permis de reconstruire les différentes étapes chronologiques des mécanismes physico-chimiques mis en œuvre lors des interactions matériaux/ liquide physiologique. L'analyse locale par faisceaux d'ions associée aux mesures globales du milieu par ICP-AES a par ailleurs montré que si ces mécanismes sont de même nature pour tous les verres étudiés, ils diffèrent par leur cinétique, leur amplitude ou leur évolution spatiale. En effet, les dopages en magnésium en zinc ralentissent les cinétiques de dissolution des verres et jouent un rôle complexe sur celles de

précipitation des phases phosphocalciques. Les verres mésostructurés et macrostructurés possèdent quant à eux une réactivité tridimensionnelle dont les caractéristiques sont essentiellement liées aux diamètres des pores et à leur interconnexion, ainsi qu'aux surfaces spécifiques et volumes poreux.

A l'issue de ce travail de thèse, plusieurs perspectives s'offrent à nous. Sur un plan physico-chimique, des caractérisations complémentaires permettraient de confirmer ou d'infirmer nos hypothèses. En premier lieu, quelque soit le type de verre, des mesures structurales sur les grains de verres après interaction, seraient des données précieuses et complémentaires à celles associées à la microsonde PIXE. Cependant deux problèmes principaux se posent : i) une mesure adaptée aux structures bien cristallisées comme la DRX, n'est pas adéquate du fait de la subsistance de la matrice silicate amorphe, de la présence de phosphates de calcium peu ou pas cristallisés. ii) l'information sur la discrimination spatiale fournie par la technique PIXE n'est pas possible lors de mesures globales comme la Diffraction des Rayons X, ou en surface du grain. L'idéal serait une technique de mesure locale et structurale comme la diffraction des électrons, ou permettant la réalisation de cartographies, comme cela peut par exemple être le cas en micro-Raman. Ces études structurales peuvent parallèlement être associées à une observation 'directe' de l'évolution de la porosité des grains par microscope électronique à transmission. Ces clichés MET peuvent être particulièrement utiles pour valider l'hypothèse d'une précipitation volumique dans le cas des verres mésoporeux et macroporeux. Enfin grâce aux derniers développements technologiques réalisés au CENBG, l'amélioration de la résolution spatiale, pour obtenir une taille du faisceau de protons de 200 nm durant l'année 2011, sera un atout majeur pour suivre la physico-chimie, non plus à l'échelle du grain, mais à l'échelle des pores ou des couches.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse se situent en amont de la chaîne d'étude des biomatériaux, c'est-à-dire de leur conception à leur test en milieu biologique. L'étude de ces verres dans un milieu cellulaire est donc indispensable. Comme nous l'avons vu, les produits issus de la dissolution de la matrice vitreuse et plus spécialement le silicium, le magnésium et le zinc, peuvent stimuler l'activité cellulaire, lorsque les cinétiques et les quantités relarguées sont adaptées, mais ces éléments peuvent aussi

provoquer la mort cellulaire si les concentrations sont trop élevées. Toujours dans cette même perspective, il serait intéressant de mener à terme l'intégration de molécules biologiquement actives dans les verres mésostructurés, afin d'observer l'effet conjoint de ces dernières sur l'activité cellulaire. A ce titre, le dosage en milieu cellulaire de marqueurs tels que la phosphatase alcaline permettrait de rendre compte de la différenciation ostéoblastique.

En complément, la caractérisation de l'interface verre bioactif/cellules osseuses par des méthodes d'analyse par faisceau d'ions permettrait l'étude des gradients de concentrations élémentaires aussi bien à l'interface qu'au sein même des organismes cellulaires. Le gain en résolution autoriserait alors l'étude de la distribution des ions intracellulaires à l'échelle des organites cellulaires.

Enfin, le dernier axe des perspectives concerne la conception de substituts pour l'ingénierie tissulaire. Ce type de matériau possède une porosité multi-échelle adaptée à la culture de cellules en son sein, ce qui permet une meilleure intégration à la suite de son implantation. Les mousses de verres bioactifs semblent être des candidats idéals pour la réparation osseuse. Plusieurs voies sont à explorer, notamment dans la maîtrise de la porosité car la taille, la hiérarchisation ou l'interconnexion influent par exemple sur l'adhésion et la prolifération des cellules, ou sur la vascularisation de l'implant.

Annexe :
Micro-analyses par
faisceaux d'ions

1.1 Interactions ions-matière

1.1.1 Différentes techniques de caractérisation

L'analyse par faisceau d'ions est un terme générique désignant toutes les méthodes basées sur l'interaction entre un faisceau de particules chargées possédant une énergie de l'ordre du MeV, avec les électrons ou les noyaux des atomes constitutifs de l'échantillon-cible. Une analyse spectroscopique des émissions secondaires de rayonnement ou de particules, consécutive à cette interaction, fournit diverses informations telles que la composition élémentaire, la concentration, la position, l'épaisseur ou de une ou plusieurs couches, la morphologie, etc. La complémentarité des ces informations est en outre rendue possible par l'utilisation simultanée des différentes techniques (décrites dans le Tableau 1-1), chacune basée sur un type d'interaction. Il est par exemple possible d'explorer quasiment tout le tableau périodique en une seule analyse multiélémentaire.

Technique	Signification	Particules incidentes	Interaction	Détection
PIXE	Particle Induced X-ray Emission	p, α	Ionisation	Photons X
RBS	Rutherford Backscattering Spectrometry	p, α	Diffusion nucléaire	p, α
STIM	Scanning Transmission Ion Microscopy	p, α	Perte d'énergie	p, α transmis
PIGE	Particle Induced Gamma-ray Emission	p	Réaction nucléaire	Photons γ
NRA	Nuclear Reaction Analysis	p, d	Réaction nucléaire	Particules chargées

Tableau 1-1 : Caractéristiques des principales techniques d'analyse par faisceau d'ions.

Les méthodes **PIXE** et **RBS** ayant été utilisées pour l'analyse élémentaire des verres bioactifs elle font l'objet de paragraphes dédiés (6.2 et 6.3)

La méthode **STIM** est basée sur une mesure de la perte d'énergie du faisceau après qu'il ait traversé une cible, suffisamment mince pour être intégralement parcourue de part en part par les projectiles. Les informations obtenues donnent accès à l'épaisseur de l'échantillon et permettent de réaliser des cartographies en contraste de densité. Bien que la méthode STIM octroie une moins bonne résolution que la microscopie électronique en transmission, elle permet d'étudier des échantillons plus épais, jusqu'à quelques dizaines de micromètres.

Les méthodes **PIGE** et **NRA** reposent sur l'analyse des émissions produites lors des réactions nucléaires consécutives au bombardement de l'échantillon par le faisceau d'ions. Dès lors qu'une particule chargée a une énergie suffisante pour vaincre la répulsion coulombienne associée au noyau de l'atome cible et que le paramètre d'impact est proche de zéro, elle peut pénétrer dans le noyau de l'atome et donner lieu à une réaction nucléaire. Le noyau cible est modifié et il y a formation d'un noyau résiduel dans un état fortement excité. Ces noyaux nouvellement composés se désintègrent ou se désexcitent en émettant des particules chargées (protons, particules α), détectées en NRA, et/ou un rayonnement gamma, détecté en PIGE. Le caractère nucléaire de ces interactions permet de différencier les isotopes d'un même élément.

En prenant en considération les éléments composant les verres bioactifs étudiés (Mg, Si, P, Ca, Zn) caractérisés par un numéro atomique Z inférieur à 30, nous avons utilisé les spectroscopies PIXE et RBS.

1.1.2 Pouvoir d'arrêt

Lorsque des particules chargées de quelques MeV pénètrent dans la matière, elles subissent une perte d'énergie graduelle. Elles sont ralenties par de multiples collisions élastiques et inélastiques le long de leur trajectoire, jusqu'à éventuellement leur arrêt complet. Dans le domaine d'énergie des microsondes nucléaires (500 keV à 5 MeV), ce processus de ralentissement est principalement dû aux multiples interactions avec les électrons. Les ions, en cédant leur énergie aux électrons des atomes, provoquent de la sorte une forte ionisation. Mais la masse d'un ion étant très supérieure à celle d'un électron, les particules incidentes sont très peu déviées et leur trajectoire est quasiment rectiligne. Néanmoins, lorsqu'ils arrivent au terme de leur parcours, les ions interagissent fortement avec les noyaux : ils subissent des chocs successifs et leur trajectoire est à ce moment considérablement modifiée. Ainsi le parcours des ions dans la matière est limité par ces deux types d'interactions : électroniques et nucléaires. Le processus total de ralentissement est bien décrit par le pouvoir

d'arrêt $S(E)$. Exprimé en MeV/cm (ou également en MeV.cm²/g), ce paramètre représente la perte d'énergie par unité de longueur traversée (ou par unité de masse superficielle traversée)¹⁴⁹ :

$$S(E) = \left| \frac{dE}{dx} \right|_{\text{en MeV/cm}} \quad (1)$$

ou

$$S(E) = \frac{1}{\rho} \left| \frac{dE}{dx} \right|_{\text{en MeV.cm}^2/\text{g}} \quad (2)$$

$$\text{Avec } \frac{dE}{dx} = \left(\frac{dE}{dx} \right)_{\text{électronique}} + \left(\frac{dE}{dx} \right)_{\text{nucléaire}} \quad (3)$$

où ρ est la densité de matière traversée (g/cm³) et x la profondeur (cm). En première approximation, la contribution du terme relatif aux interactions nucléaires est négligeable dans le domaine d'énergie s'étalant de 500 keV à 5 MeV.

Les pouvoirs d'arrêt de la plupart des éléments du tableau périodique ont été déterminés expérimentalement ou par des relations semi-empiriques.¹⁵⁰ Le pouvoir d'arrêt $S_M(E)$ d'un matériau composé de n éléments est calculé grâce à une loi d'additivité énoncée par Bragg, considérant que la perte d'énergie globale est la somme des pertes d'énergies $S_i(E)$ dues aux différents éléments i , proportionnellement à leur abondance dans le matériau :

$$S_M(E) = \sum_{i=1}^n w_i \cdot S_i(E) \quad (4)$$

où w_i est la fraction massique de l'élément i .

Le parcours R d'un ion dans la matière donne une bonne estimation de la profondeur d'arrêt de l'ion dans le matériau. Il est calculé par intégration du pouvoir d'arrêt :

$$R = \int_{E_0}^0 \frac{dE}{S(E)} \quad (5)$$

où E_0 est l'énergie initiale de l'ion incident.

1.2 Emission X induite par des particules chargées

Après sa mise au point par Sven Johansson¹⁵¹, la méthode PIXE s'est rapidement répandue dans de nombreuses disciplines, contribuant ainsi à étendre largement ses domaines d'applications notamment l'art, l'archéologie, les sciences du vivant, la science des matériaux, l'électronique, etc...

1.2.1 Mécanisme d'émission X

Le mécanisme qui sous-tend la technique PIXE s'effectue en deux temps (Figure 1-1) :

A- Dans un premier temps survient l'**ionisation** de l'atome cible suite à son bombardement par le faisceau d'ions incidents. En effet, l'éjection d'un électron hors de son orbitale des couches atomiques profondes, engendre la création d'une lacune électronique.

B- Le cortège électronique de l'atome ionisé se réorganise rapidement (10^{-17} à 10^{-13} s) pour retomber vers un état de plus faible énergie. Plusieurs processus concurrentiels de relaxation de l'atome ionisé entrent alors en jeu : l'émission d'un rayonnement X caractéristique qui correspond à une transition radiative et qui est le signal recueilli en PIXE, et les transitions non-radiatives notamment les effets Auger et Coster-Krönig.

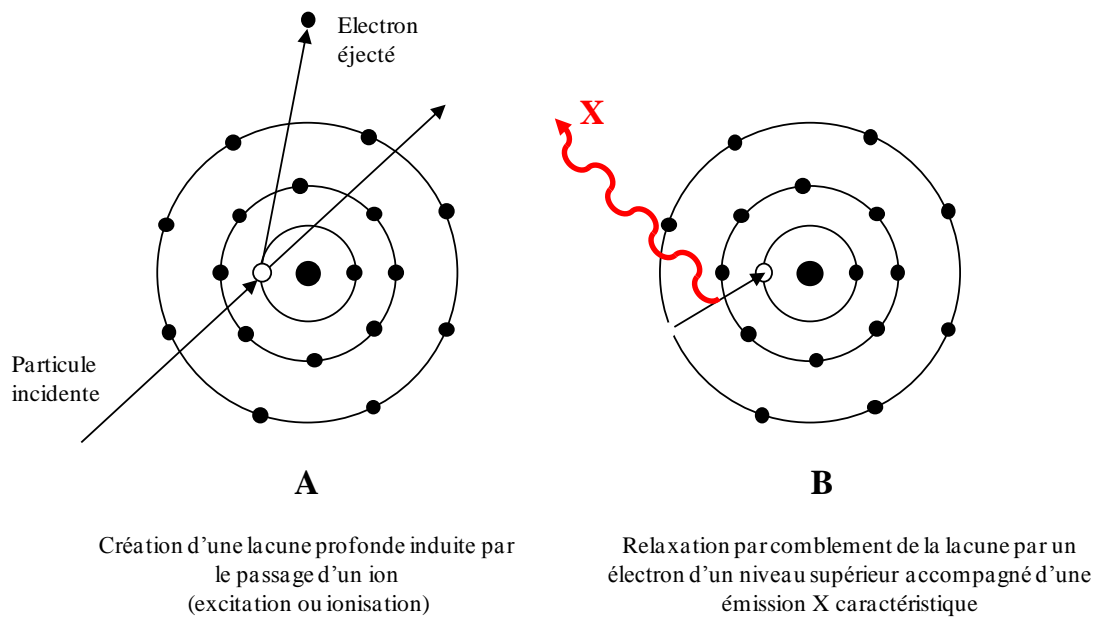


Figure 1-1 : Principe de l'émission X induite par particules chargées (PIXE).

Dans le cas d'une transition radiative, l'énergie du photon X est caractéristique du numéro atomique Z de l'élément émetteur, selon la loi énoncée par Moseley en 1914 ¹⁵² :

$$E = C (Z-s)^2$$

où C et s sont des constantes dépendant du type de raie correspondant à la transition spectrale.

Toutes les transitions radiatives ne sont pas permises. Elles sont possibles seulement si les règles de sélection, établies par la mécanique quantique sont respectées. Ces dernières dépendent des différents nombres quantiques : n , le nombre quantique principal, l , le nombre quantique associé au moment angulaire orbital et J , le nombre quantique associé au moment angulaire total. Les règles de sélection doivent respecter les relations suivantes :

$$\Delta n \geq 1, \Delta l = \pm 1 \quad \text{et} \quad \Delta J = \pm 1 \text{ ou } 0$$

Les transitions radiatives autorisées sont présentées sur la Figure 1-2.

Les règles sélectives impliquent qu'à la suite d'une ionisation de la couche K, les seules raies X qui puissent être émises correspondent aux transitions $L_{II}-K$ et $L_{III}-K$ (notées respectivement $K_{\alpha 1}$ et $K_{\alpha 2}$ dans la nomenclature de Siegbahn), aux transitions $M-K$ (notées raies $K_{\beta 1}$, $K_{\beta 3}$), ou encore aux transitions $N-K$ (notées $K_{\gamma 1}$, $K_{\gamma 2}$). Généralement l'émission du

groupe K_β est moins probable que celle du groupe K_α . D'autre part, la différence d'énergie entre certaines raies appartenant à la même série est inférieure à la résolution des détecteurs Si(Li) (cf. paragraphe 6.4.3.2); c'est le cas par exemple entre les raies $K_{\alpha 1}$ - $K_{\alpha 2}$ et entre les raies $K_{\beta 1}$ - $K_{\beta 3}$, ceci jusqu'au numéro atomique $Z = 40$. Sur les spectres X obtenus avec de tels détecteurs, ces raies d'énergie proches sont confondues. Ainsi on regroupe souvent ces transitions spectrales, en définissant une raie unique K_α ou K_β , somme des contributions dues aux différentes transitions L-K ou M-K, pondérées par leurs intensités respectives m_i :

$$K_\alpha = \sum_i m_i \cdot K_{\alpha_i} \quad , \quad K_\beta = \sum_i m_i \cdot K_{\beta_i}$$

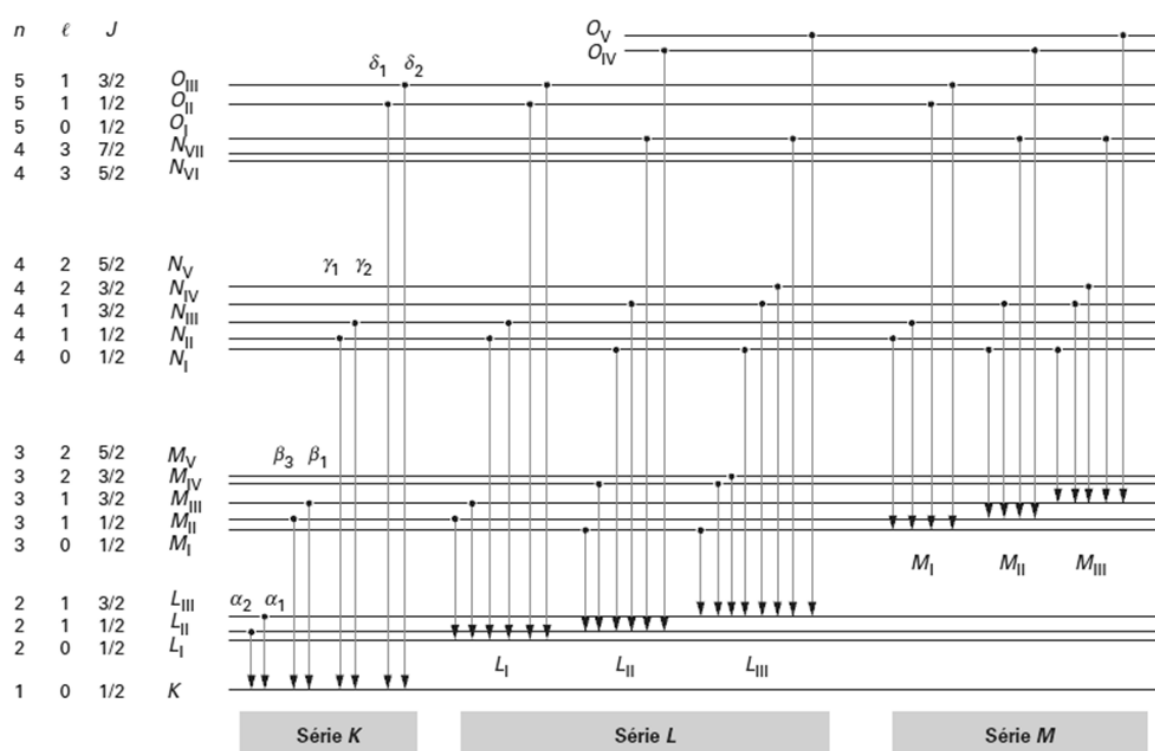


Figure 1-2 : Principales transitions radiatives autorisées pour les séries K, L, M.¹⁵³

De même on définit pour la série L les raies L_α , L_β et L_γ . La Figure 1-3 représente l'évolution des énergies caractéristiques des raies K, L et M suivant le numéro atomique.¹⁵³ Il en résulte que l'analyse d'un échantillon se fera préférentiellement au moyen des raies K et L. Le choix de l'une ou l'autre se fonde sur le numéro atomique des éléments en présence, sans oublier les caractéristiques du détecteur de photons X ; par exemple l'efficacité des détecteurs Si(Li) est constante sur l'intervalle d'énergie 1-25 keV, mais chute grandement en dehors. En pratique, les éléments de $Z < 50$ sont analysés via leurs raies K tandis que ceux de $Z > 50$ le sont via

leurs raies L. Sur ces considérations, les verres bioactifs seront étudiés au moyen des raies K pour les éléments silicium, phosphore, calcium, magnésium et zinc.

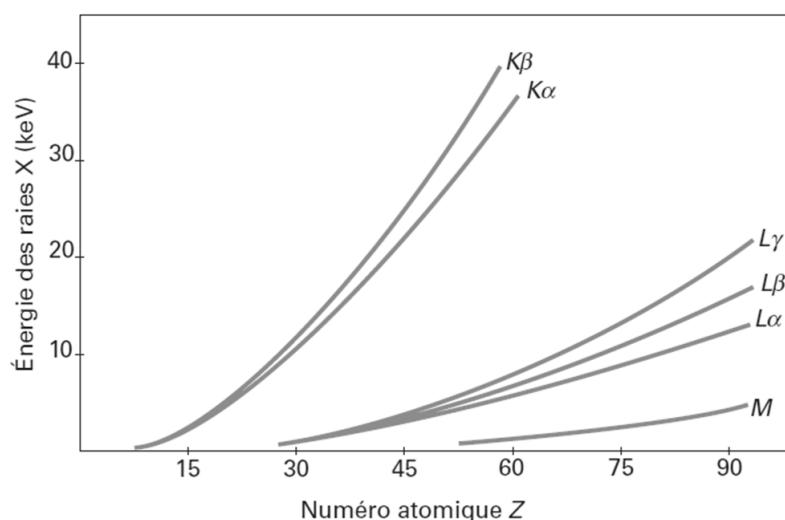


Figure 1-3 : Energies caractéristiques des raies K, L, M en fonction du numéro atomique Z.¹⁵³

1.2.2 Rendement de fluorescence et sections efficaces

1.2.2.1 Rendement de fluorescence

Comme nous l'avons vu précédemment, outre le rayonnement X, deux processus permettent à l'énergie libérée suite à une transition électronique d'être dissipée : émission Auger et transition de Coster-Krönig (Figure 1-4)

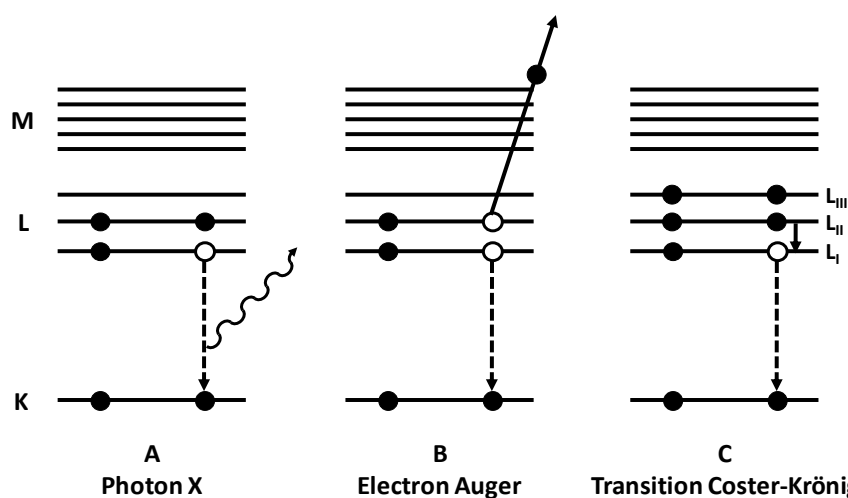


Figure 1-4 : Désexcitation par A-émission d'un photon X, B-émission d'un électron Auger, C-Transition de Coster-Krönig.

Dans le cas de l'émission Auger, l'énergie est dissipée par l'éjection d'un électron d'un état moins lié. La probabilité d'avoir un effet Auger augmente à mesure que la différence d'énergie entre les états potentiellement impliqués dans ce phénomène diminue. La probabilité d'effet Auger est donc maximale pour les éléments légers. Le réarrangement du cortège électronique qui suit l'émission d'un électron Auger octroie alors une nouvelle opportunité pour l'émission d'un photon X, qui sera cette fois-ci caractéristique du nouvel emplacement de la lacune.

Les transitions de Coster-Krönig, quant à elles, ne concernent pas la couche K. Elles consistent en la redistribution de la lacune électronique entre les sous-couches d'un même niveau de nombre quantique principal donné. Les transitions de Coster-Krönig sont plus rapides que les transitions intercouche : à cause de cette redistribution, une lacune originellement créée dans une sous-couche peut être déplacée vers une sous-couche supérieure, puis être comblée par une autre transition, radiative ou non.

Ces trois phénomènes sont en compétition, et leurs contributions relatives sont généralement caractérisées pour un élément Z et pour une couche donnée, par le rendement ω . Ce paramètre représente la probabilité pour qu'une lacune créée sur cette couche donne lieu à l'émission d'un photon X (ou encore le rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de lacunes créées dans cette couche).

L'évolution du rendement de fluorescence est représentée sur la Figure 1-5. Il apparaît d'une part que l'émission Auger est prépondérante pour les éléments légers alors que les transitions radiatives dominent pour les atomes lourds¹⁵⁴, et d'autre part que le rendement de la couche L est beaucoup plus faible que celui de la couche K.

Si les rendements de fluorescence des couches L ne sont pas connus avec une grande précision (entre 20 et 30 % d'incertitudes pour ceux des éléments légers), ceux des couches K ont été déterminés expérimentalement avec une erreur relative inférieure à 5 % et peuvent être modélisés au moyen de la relation empirique suivante¹⁵⁵ :

$$\left(\frac{\omega_K}{1-\omega_K} \right)^{1/4} = 0,033 + 0,032 \cdot Z - 2,810^{-7} \cdot Z^3$$

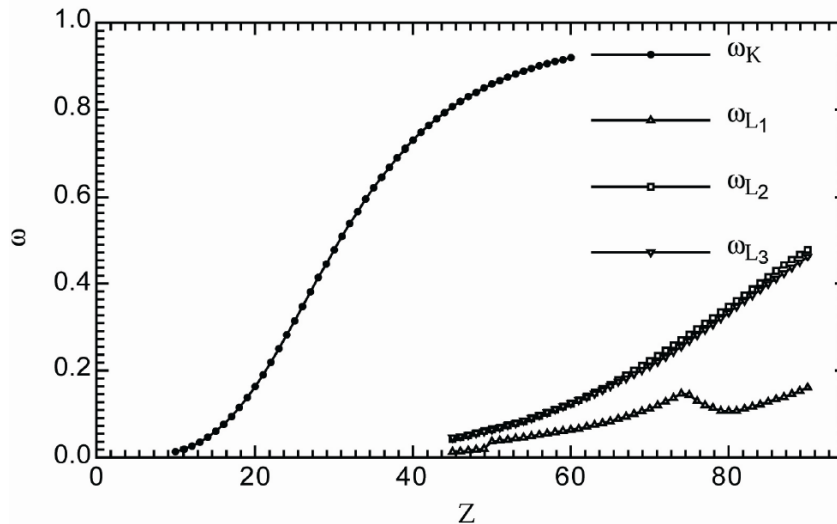


Figure 1-5 : Rendement de fluorescence expérimental des couches K et L, en fonction du numéro atomique Z.¹⁵⁶

1.2.2.2 Section efficace d'ionisation

La probabilité d'ionisation d'une couche atomique par le faisceau de particules incident est décrite par la section efficace d'ionisation, notée σ_s^I où $s = K, L, M, \text{ etc.}$ Plusieurs modèles théoriques décrivent l'ionisation des couches atomiques profondes suite à leur bombardement par des ions. Ils sont valables dans la gamme d'énergie utilisée en PIXE, à savoir de 0,5 à 5 MeV par nucléon. Leur principe repose sur l'interaction coulombienne entre un électron lié et le noyau de la particule chargée incidente et donnent accès au calcul de la section efficace d'ionisation d'un atome par une particule chargée. Parmi les modèles les plus employés, on peut citer l'approximation de Born en ondes planes (PWBA)¹⁵⁷, l'approximation semi-classique, (SCA)¹⁵⁸, et l'approximation du choc binaire (BEA)¹⁵⁹. La description de ces modèles n'étant pas l'objet de cette thèse, ces modèles ne seront pas détaillés dans le cadre de ce travail. Il est cependant utile de retenir les idées suivantes :

- Pour une énergie d'incidence E fixée, σ_s^I décroît rapidement à mesure que le numéro atomique Z de la cible augmente.
- Pour un atome cible de numéro atomique Z donné, σ_s^I augmente avec E , atteint une valeur maximale puis diminue. L'énergie correspondant au maximum est d'autant plus élevée que Z est grand.

- Dépendance de σ_s^I en $\left(\frac{E}{A}\right)^4$ en fonction de l'énergie par nucléon (E/A) du projectile. Ceci explique notamment le choix d'utiliser des protons plutôt que des particules alpha, en vue d'optimiser la section efficace d'ionisation.

Les utilisateurs de la technique PIXE, sont plus spécifiquement intéressés par la théorie ECPSSR^{b,160} (dérivée du modèle PWBA^{c,161}), développée par Brandt et Lapicki et validée expérimentalement par Johansson et Campbell¹⁶². Ces valeurs font désormais référence et sont notamment utilisées par le logiciel GUPIX, que nous utilisons dans le traitement des spectres PIXE.

1.2.2.3 Section efficace totale de production de rayons X

L'analyse quantitative des données spectrales acquises en PIXE nécessite la connaissance de la section efficace de production des rayons X notée σ_s^X . La section efficace de production σ_s^X concernant une transition radiative ayant lieu sur la couche s est exprimée à partir des paramètres précédemment décrits :

$$\sigma_s^X = \sigma_s^I \omega_s k$$

Avec k : la probabilité relative que la raie X considérée soit émise ; c'est le rapport de l'intensité d'émission de la raie considérée ($K_\alpha, K_\beta \dots$) sur l'intensité totale des rayons X émis par la couche s. Les sections efficaces des raies K et des raies L cumulées ont été déterminées par Grime et Watt¹⁶³ pour des protons de diverses énergies d'incidence, sur la base des travaux de Johansson. Les valeurs de ces sections efficaces pour les raies K_α en fonction de l'énergie sont tracées sur la Figure 1-6.

^b Energy loss, Coulomb field, Perturbation of the atomic Stationary States, Relativistic effects.

^c Plane Wave Born Approximation.

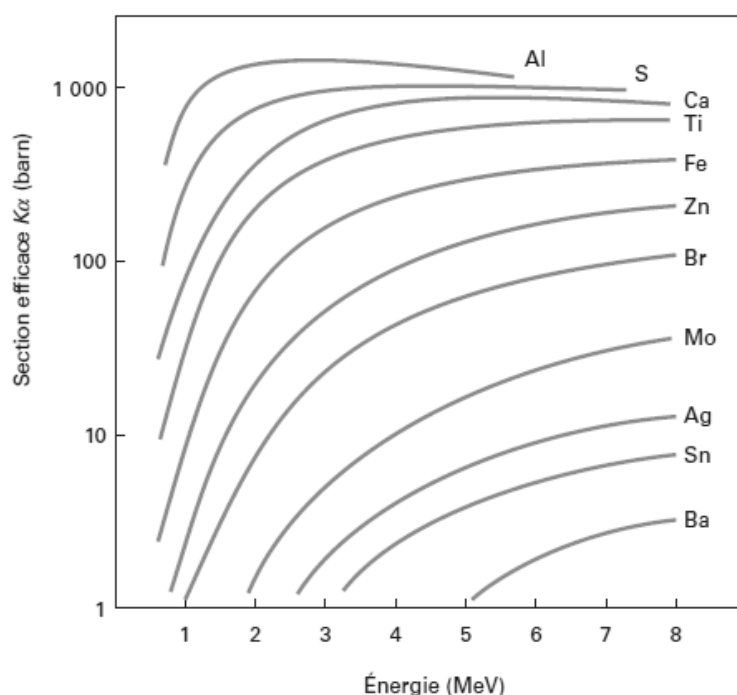


Figure 1-6 : Section efficace de production des rayons X pour les raies K_{α} de quelques éléments en fonction de l'énergie incidente du faisceau de protons.¹⁵³

Pour l'émission de raies K_{α} , il s'avère que les sections efficaces de production des rayons X peuvent dépasser la centaine de barns^d pour les éléments de numéro atomique situé entre 12 et 35. Ainsi, une énergie d'incidence de l'ordre du MeV est déjà suffisante pour atteindre la section efficace optimale des raies K de la majorité des éléments constitutifs de nos verres bioactifs, à savoir le silicium, le phosphore, le calcium. En revanche, le zinc étant un élément plus lourd ($Z = 30$), l'optimisation de la section efficace de cet élément impose d'augmenter l'énergie d'incidence des protons.

Sur ces considérations, il a été choisi d'analyser les verres bioactifs au moyen d'un faisceau de protons d'énergie 1,5 MeV pour tous les verres étudiés, à l'exception de ceux dopés en zinc, pour lesquels l'énergie a été fixée à 3 MeV.

^d Un barn vaut 10^{-24} cm², dimension qui correspond approximativement à 10 fois la section géométrique d'un proton.

1.2.1 Bruit de fond et interférences spectrales

1.2.1.1 Bruit de fond continu

La sensibilité de la technique PIXE peut être limitée par un bruit de fond continu apparaissant sur les spectres X. Dans notre cas (faisceau incident de protons, d'énergie inférieure ou égale à 3 MeV), il provient essentiellement du rayonnement de freinage ou Bremsstrahlung. Ce rayonnement X est dû à l'accélération ou à la décélération de particule. Dans notre cas, il s'agit du ralentissement ou de la déviation de particules chargées par le champ électrique des noyaux de la cible. En effet selon les équations de Maxwell, toute charge dont la vitesse varie, en valeur absolue ou en direction, rayonne. Ce phénomène concerne deux types de particules :

- **Les électrons secondaires** éjectés de la cible pendant l'irradiation. Cette composante est limitée à la partie basse du spectre. La limite supérieure en énergie E_{\max} , correspond à l'énergie maximale qu'un proton incident peut transmettre à un électron libre au cours d'une collision directe :

$$E_{\max} = 4 \frac{m_e}{M} \cdot E \quad (1)$$

E est l'énergie d'incidence du proton.

M est la masse du proton.

m_e est la masse de l'électron.

- **Les particules incidentes.** Leur rayonnement de freinage prédomine à haute énergie sur le spectre. La section efficace de ce phénomène est :

$$\frac{d\sigma}{dE_X} = C \cdot \frac{A \cdot Z^2 \cdot Z_1^2}{E \cdot E_X} \cdot \left(\frac{Z}{A} - \frac{Z_1}{A_1} \right) \quad (2)$$

E_X est l'énergie du rayonnement X émis.

Z , A et E sont respectivement la charge, la masse et l'énergie de la particule incidente.

Z_1 et A_1 sont la charge et la masse de l'atome cible.

Cette section efficace est inversement proportionnelle à l'énergie E d'incidence. D'autre part ce bremsstrahlung s'annule lorsque projectile et cible ont le même rapport Z/A .

1.2.1.2 Fluorescence secondaire

La fluorescence secondaire est observée lorsqu'une raie très intense est émise par l'échantillon sous irradiation. L'énergie des photons X leur permet alors d'ioniser de nouveaux atomes (photo-ionisation). Seules les couches dont le seuil d'absorption critique est situé au dessous de l'énergie de la raie X primaire peuvent être ionisées, ce qui se traduit concrètement par le fait que seuls les atomes-cibles dont le numéro atomique Z est inférieur à celui de l'atome émetteur primaire peuvent induire ce phénomène. Par ailleurs la probabilité de photo-ionisation est d'autant plus grande, que la différence d'énergie entre la raie primaire et le seuil d'absorption critique de l'atome est faible. La fluorescence secondaire apparaît par conséquent en excitation K vers K pour des éléments émetteurs primaires et secondaires de numéro atomique très proche, et en excitation L vers K pour des couples émetteurs primaires lourds et émetteurs secondaires légers. Si les conditions favorables à ce phénomène sont réunies, la contribution de la fluorescence secondaire à l'émission X totale peut atteindre plusieurs dizaines de pourcent. Sur le spectre X , cette fluorescence a comme conséquence une diminution de l'intensité de la raie de l'émetteur primaire au profit de celle de la raie de l'émetteur secondaire, induisant une quantification erronée du spectre X . La formule de Reuter¹⁶⁴, qui exprime le rapport des intensités entre l'émission primaire et l'émission secondaire, permet d'apporter les corrections nécessaires pour une quantification juste.

1.2.2 Analyse quantitative

1.2.2.1 Calcul des concentrations

L'analyse quantitative consiste à identifier les raies caractéristiques des éléments sur le spectre X , et à convertir leur intensité en concentration élémentaire. Pour un faisceau de N_p particules incidentes bombardant une cible constituée d'un élément de numéro atomique Z , le nombre dN_Z^X de photons émis pour une raie particulière sur une distance dx du parcours des protons est :

$$dN_Z^X = N_p \cdot N_Z \cdot \sigma_s^X(Z, E) \cdot dx \quad (1)$$

N_Z : concentration de l'élément Z en atomes/cm³.

N_p : nombre de particules incidentes.

dx : élément d'épaisseur de cible où a lieu l'interaction et est exprimé en cm.

σ_s^X : section efficace totale de production des rayons X (paragraphe 6.2.2.3)

L'équation (1) peut également être exprimée en terme de concentration massique de l'élément Z selon :

$$dN_Z^X = N_p \cdot \frac{C_Z \cdot N_A}{A_Z} \cdot \sigma_s^X(Z, E) \cdot dx \quad (2)$$

C_Z est la concentration massique de l'élément Z en g/cm³.

N_A est le nombre d'Avogadro : $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$ atomes/mol.

A_Z est la masse molaire de l'élément Z.

Cependant le nombre réel de photons collectés par le détecteur diffère de l'équation (1) ; pour accéder au nombre réel il faut faire intervenir des paramètres liés à l'atténuation des photons X ainsi que d'autres liés à la détection et au dénombrement des particules incidentes :

$$dN_Z^X = N_p \cdot N_Z \cdot \sigma_s^X(Z, E) \cdot T_{éch}(Z, E) \cdot T_{abs}(Z) \cdot \varepsilon \cdot \frac{\Omega}{4\pi} \cdot dx \quad (3)$$

Ω est l'angle solide de détection.

ε est l'efficacité du détecteur.

T_{abs} est le coefficient de transmission à travers les divers filtres absorbants.

$T_{éch}$ est le coefficient de transmission correspondant à l'atténuation des photons par l'échantillon lui-même.

Les paramètres Ω et ε sont connus de l'utilisateur. La section efficace σ_s^X est accessible à partir d'ouvrages de référence. Le nombre de particules incidentes N_p est déduit de la mesure de la charge totale collectée sur l'échantillon, fournie par les données enregistrées par RBS (cf. paragraphe 6.3). Quant aux coefficients de transmission, ils peuvent être exprimés sous la forme :

$$T_{abs}(Z) = \exp(-\mu_{abs} \cdot t_{abs}) \quad (4)$$

$$T_{éch}(Z,E) = \exp - (\mu_{éch} \cdot t_{éch}) = \exp - \mu_{éch} \cdot \left(\frac{\cos \theta}{\cos \phi} \cdot \int_{E_0}^{E_f} \frac{dE}{S(E)} \right) \quad (5)$$

μ est le coefficient d'atténuation linéaire.

t est l'épaisseur de matière traversée par le photon.

E_f est l'énergie finale du faisceau incident.

ϕ et θ sont respectivement l'angle d'incidence du faisceau et l'angle de détection des rayons X par rapport à la normale à la surface de l'échantillon.

D'après l'équation (3), pour obtenir un résultat quantitatif sur la concentration N_Z d'un élément, il suffit d'accéder au nombre de photons mesurés dN_Z^X : celui-ci s'obtient en intégrant la surface du pic caractéristique de l'élément Z considéré sur le spectre PIXE. Deux cas de figure sont cependant à distinguer : les cibles minces, comme la plupart des échantillons biologiques ou encore les aérosols par exemple, et les cibles épaisses.^{151,153}

- Dans le cas des **cibles minces**, la perte d'énergie des particules incidentes est suffisamment faible pour que la section efficace soit considérée constante tout au long du parcours des projectiles dans l'échantillon. Les phénomènes secondaires d'absorption des X et de fluorescence sont également négligés. Les calculs sont alors simples et l'équation (3) est intégrée telle quelle, en considérant la section efficace à l'énergie d'incidence E_0 et en négligeant les effets de matrice du terme $T_{éch}$:

$$N_Z^X = N_p \cdot N'_Z \cdot \sigma_s^X(Z, E_0) \cdot T_{abs}(Z) \cdot \varepsilon \cdot \frac{\Omega}{4\pi} \quad (6)$$

avec $N'_Z = N_Z \cdot x$ est exprimé en atomes/cm².

- Dans le cas des **cibles épaisses**, il faut tenir compte des effets de matrice sur les particules incidentes, qui sont ralenties jusqu'à leur implantation dans le matériau, des effets de matrice sur l'atténuation des photons X émis, ainsi qu'évaluer la contribution de la fluorescence secondaire. Il est par conséquent nécessaire d'intégrer sur tout le parcours du projectile et de faire intervenir le pouvoir d'arrêt en remplaçant dx par le parcours élémentaire $dE/S(E)$:

$$N_Z^X = N_p \cdot N_Z' \cdot T_{abs}(Z) \cdot \varepsilon \cdot \frac{\Omega}{4\pi} \cdot \int_{E_0}^0 \frac{\sigma_s^X(Z, E) \cdot T_{ech}(Z, E)}{S(E)} dE \quad (7)$$

Plusieurs approches sont possibles pour la détermination des différents paramètres intervenant dans les calculs. Des échantillons de référence peuvent par exemple être utilisés pour étalonner les rendements d'émission et de transmission des photons X. Mais cette méthode n'est évidemment valable que dans des conditions expérimentales très précises. Nous avons choisi d'utiliser une méthode absolue, qui consiste à utiliser des valeurs tabulées pour les sections efficaces de production des photons X et les coefficients de transmission. Cette méthode nécessite l'utilisation de logiciels de traitement disposant de bases de données, GUPIX¹⁶⁵, logiciel utilisé dans le cadre de notre étude.

1.2.2.2 Traitement des données avec le code GUPIX

GUPIX est un programme de conversion des intensités des pics caractéristiques en concentrations élémentaires. Il s'appuie pour cela sur la réalisation d'un spectre théorique qui est modélisé sur la base des valeurs de référence concernant les procédés de fluorescence, les effets de matrice et de détection, et bien sûr grâce aux paramètres expérimentaux fournis par l'utilisateur. Ceux-ci concernent l'énergie du faisceau, l'angle solide de détection, les paramètres décrivant le détecteur de photons X, la charge déposée sur l'échantillon et son épaisseur, ces deux derniers paramètres étant calculés à partir du spectre RBS (cf. paragraphe 6.3).

Le spectre X expérimental est constitué des raies caractéristiques qui ont la forme de pics gaussiens. Ces pics caractéristiques sont superposés à l'émission continue du bruit de fond. Afin d'assurer une juste quantification de la surface des pics, l'émission continue est éliminée par filtrage numérique des données expérimentales.

Les informations parasites ainsi supprimées, le modèle mathématique du spectre théorique est ajusté au spectre expérimental de manière fidèle au moyen de la méthode non linéaire des moindres carrés. La méthode admet que la fonction théorique qui décrit les données avec la plus grande justesse est celle qui minimise la somme quadratique des déviations des mesures expérimentales vis-à-vis des données prédites théoriquement.¹⁶⁶ La procédure d'ajustement consiste en une boucle d'itération : les calculs sont continuellement renouvelés jusqu'à ce que les différentes concentrations élémentaires satisfassent à un critère de convergence.

Une fois le spectre théorique modélisé, les intensités des pics caractéristiques sont converties en concentrations élémentaires au moyen d'une relation analogue à l'équation (3) du paragraphe précédent :

$$C_Z = \frac{I_Z^X}{I_t \cdot Q \cdot H \cdot \varepsilon_i \cdot T_{abs}} \quad (1)$$

C_Z : concentration de l'élément de numéro atomique Z .

I_Z^X : intensité mesurée expérimentalement pour la raie X considérée.

I_t : intensité théorique calculée pour le spectre modélisé par unité de concentration, par stéradian et par μC .

Q : charge déposée par le faisceau sur la cible : (donné par la RBS).

ε_i : efficacité intrinsèque du détecteur, d'une valeur proche de 1 pour des énergies entre 5 et 20 keV.

T_{abs} : coefficient de transmission à travers les filtres placés devant le détecteur.

H : paramètre instrumental décrivant le système.

En l'absence de filtres supplémentaires devant le détecteur, le paramètre H représente l'angle solide et est exprimé en stéradian :

$$H = 2\pi \cdot (1 - \cos \alpha) \approx \frac{S}{d^2} \quad (2)$$

α : angle d'ouverture du détecteur sur l'échantillon,

S : surface du détecteur

d : distance entre la cible et le détecteur.

En présence de filtres absorbants, placés devant le détecteur, H n'est plus l'angle solide mais un paramètre instrumental dont la valeur dépend de l'énergie des photons X , et qui tient compte de la mauvaise connaissance de l'angle solide et du filtre utilisé (épaisseur et/ou diamètre du trou pour un 'funny filter'). H doit être dans ce cas calibré. Dans l'équation (1), l'introduction du paramètre H explique donc l'apparition de l'efficacité intrinsèque ε_i du détecteur au lieu de l'efficacité de détection ε .¹⁶⁷

Dans la pratique, pour s'affranchir des incertitudes liées à certains paramètres tels que l'efficacité de détection, l'angle solide et la charge déposée sur l'échantillon, il est possible de normaliser les concentrations élémentaires à 100 %. Dans ce cas, lors des calculs de

concentrations GUPIX, fait intervenir un terme supplémentaire dans le dénominateur de l'équation (1) : ce paramètre correctif permet d'ajuster la valeur du produit $Q \cdot H \cdot \varepsilon_i \cdot T_{abs}$, qui n'est pas toujours connue avec exactitude, afin de normaliser la somme des différentes concentrations élémentaires à 100 %. Cette normalisation est bien évidemment rendue possible grâce à la connaissance de la composition chimique de nos échantillons. Bien que certains éléments chimiques, tels l'oxygène, ne soient pas détectables, GUPIX peut assumer que leur concentration est dépendante de celle des autres éléments détectables ; il suffit alors d'entrer les valences supposées des éléments non détectables dans le code pour que GUPIX dresse une liste des différents composés potentiellement existants. La teneur des éléments non détectables est alors estimée par les relations de stoechiométrie liant les différents éléments constitutifs de ces composés. Grâce à cette procédure, la normalisation des concentrations est rendue possible malgré la présence de certains éléments non détectables.

Les incertitudes sur la quantification sont dues aux erreurs statistiques sur l'évaluation de la surface des pics, aux erreurs sur l'ajustement du spectre modélisé, aux erreurs liées aux chevauchements de certains pics, et aux erreurs inhérentes aux facteurs instrumentaux. L'erreur relative totale sur les concentrations est exprimée selon :

$$\frac{\Delta C_Z}{C_Z} = \sqrt{S^2 + F^2 + O^2 + I^2} \quad (2)$$

C_Z : concentration de l'élément de numéro atomique Z .

S : erreur statistique sur l'évaluation de la surface des pics.

F : erreur liée à la procédure d'ajustement du spectre modélisé.

O : erreur liée aux chevauchements de certains pics.

I : incertitude liée aux facteurs instrumentaux tels que les erreurs sur la mesure de la charge déposée sur l'échantillon, les dégâts dus à l'irradiation, etc.

Les paramètres S et F sont évalués par GUPIX à chaque analyse quantitative. Le logiciel considère également que l'erreur O est systématique et sa valeur est estimée à 1 %. Enfin il appartient à chaque utilisateur d'évaluer les incertitudes liées à l'expérimentation. Les incertitudes liées à la mesure de la charge déposée sont estimées à 1%.

1.2.3 Pourquoi choisir l'analyse quantitative par PIXE ?

La méthode PIXE possède de nombreux atouts, parmi lesquels l'aspect multiélémentaire, qui permet d'analyser simultanément les éléments de numéro atomique supérieur à 11, ou encore la possibilité de l'associer à d'autres techniques (RBS, STIM...). Cependant, son intérêt majeur réside dans sa très bonne sensibilité. Pour qu'un élément soit détecté, il faut que l'intensité N_Z^X d'un signal caractéristique puisse être distinguée de façon significative de l'intensité N_B du fond continu. C'est le cas si :

$$N_Z^X \geq 3\sqrt{N_B}$$

où N_Z^X est le nombre d'événements sous le pic caractéristique de l'élément considéré, et N_B est le nombre d'événements dus au fond continu sous le pic, dans l'intervalle de la largeur à mi-hauteur. Sur la Figure 1-7/A, cette limite relative de détection est présentée pour la PIXE en fonction de l'énergie d'incidence des protons et du numéro atomique de l'atome cible. La sensibilité maximale en PIXE est obtenue pour les éléments situés dans les domaines de numéro atomique $20 \leq Z \leq 35$ et $70 \leq Z \leq 85$. Il est également observé que la quasi-totalité du tableau périodique est couverte avec une limite relative de détection inférieure à 5 ppm.

Comparativement à la fluorescence X classique, induite par des électrons de quelques dizaines de keV, traditionnellement couplés aux microscopes électroniques, le fond continu est diminué d'un facteur 1000, et la limite de détection est abaissée en proportion. Cette grande sensibilité mise au service de nos échantillons possède un avantage double :

- Elle rend possible la détection et la quantification des éléments traces dans nos verres bioactifs (Zinc et Magnésium)
- Des cartographies chimiques représentatives peuvent être réalisées relativement rapidement (environ 60 minutes par échantillon), grâce à un temps de comptage nécessaire moindre. Cela nous a permis de construire des cinétiques de réaction (0) du fait de l'analyse de multiples échantillons.

Par ailleurs, dans le domaine d'énergie utilisé en PIXE, les interactions électroniques modifient très peu la trajectoire des particules incidentes ; celles-ci demeurent linéaires et permettent de conserver la qualité dimensionnelle d'un microfaisceau, contrairement aux trajectoires des électrons qui subissent un élargissement important (poire d'interaction dans le

matériau représenté en Figure 1-7/B). Sur des échantillons épais, la très bonne résolution de la microscopie électronique est perdue, et est similaire à celle de la PIXE, où la taille du faisceau d'ions peut actuellement descendre jusqu'au demi micron. On peut remédier à cela en microscopie électronique à transmission, en réalisant des coupes ultrafines du matériau, de l'ordre de 80-100 nm d'épaisseur : cependant couper des échantillons de verre bioactif à de telles épaisseurs est bien plus contraignant qu'en PIXE, où les coupes peuvent être plus épaisses, de 0,4 à 30 μm selon les échantillons.

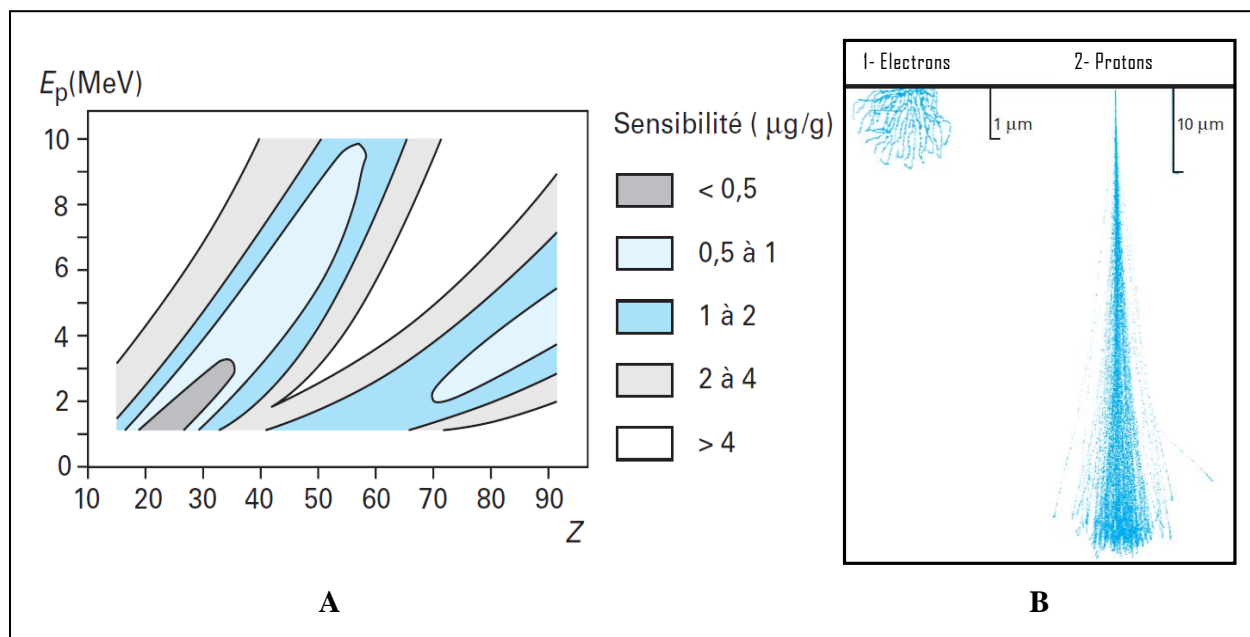


Figure 1-7 : A-Sensibilité de la PIXE en fonction du numéro atomique et de l'énergie des protons incidents.¹⁶⁸ B- Parcours comparés des électrons de 20 keV et des protons de 3 MeV dans de la zircone.¹⁶⁹

1.3 Spectrométrie de rétrodiffusion Rutherford: RBS

La spectroscopie de rétrodiffusion Rutherford est la plus largement utilisée des méthodes d'analyse par faisceau d'ions, et elle est basée sur l'interaction coulombienne entre les ions incidents et les noyaux cibles. Cette technique découle ainsi directement de l'application des lois de la cinématique. Elle permet, via la mesure de l'énergie des ions rétrodiffusés, de déterminer la nature, la concentration, la profondeur des atomes-cibles.

1.3.1 Aspects cinématiques

Lorsque l'échantillon est bombardé par un faisceau de particules, une fraction de celles-ci est diffusée élastiquement par les noyaux cibles vers un détecteur qui mesure leur

énergie. En considérant le choc élastique (Figure 1-8) d'une particule de masse M_1 , vitesse v_0 , énergie cinétique E_0 avec un atome cible de masse M_2 , initialement au repos, les principes de conservation de l'énergie et de la quantité de mouvement imposent :

$$\frac{1}{2}M_1v_0^2 = \frac{1}{2}M_1v_1^2 + \frac{1}{2}M_2v_2^2 \quad (1)$$

$$\overrightarrow{M_1v_0} = \overrightarrow{M_1v_1} + \overrightarrow{M_2v_2} \quad (2)$$

Avec

v_1 : vitesse de la particule de masse M_1 près de le choc

v_2 : vitesse de la particule de masse M_2 près de le choc

Ces égalités permettent d'exprimer l'énergie E_1 du projectile après la collision selon :

$$E_1 = K.E_0 \quad (3)$$

$$K = \left(\frac{(M_2^2 - M_1^2 \sin^2\theta)^{1/2} + M_1 \cos \theta}{M_1 + M_2} \right)^2 \quad (4)$$

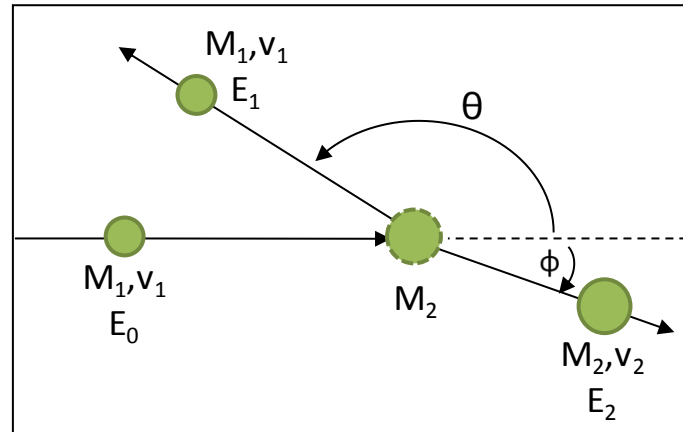


Figure 1-8 : Collision élastique entre une particule de masse M_1 , animée d'une vitesse v_0 , avec un atome de masse M_2 , initialement au repos.

Dans les équations (3) et (4), les paramètres E_0 , M_1 , et θ sont connus ; la mesure de l'énergie de la particule diffusée E_1 suffit donc pour déterminer la masse M_2 et par suite identifier l'atome cible. Le facteur cinématique K dépend uniquement de l'angle de diffusion θ et du rapport des masses de l'ion incident et de l'atome diffuseur. En revanche il ne dépend pas de

l'énergie du projectile. L'énergie transférée à l'atome cible est maximale lorsque K est minimum, ce qui est le cas pour une diffusion à 180° . Dans ce cas, il faut nécessairement $M_1 < M_2$ c'est-à-dire que les particules incidentes soient plus légères que les atomes cibles. Le facteur cinématique s'avère avoir une incidence sur la résolution en masse de la méthode. En effet, dans le cas où l'angle de détection est proche de 180° et où $M_1 \ll M_2$, la différence d'énergie ΔE_1 entre deux atomes de masse proche sera exprimée en fonction de la différence de leurs masses ΔM_2 suivant :

$$\Delta E_1 = E_0 \cdot M_1^2 \frac{4 - (\pi - \theta)^2}{M_2^2} \Delta M_2 \quad (5)$$

Par conséquent, la résolution en énergie sera d'autant meilleure que M_2 est faible. Ceci explique que la technique RBS soit une méthode efficace pour l'identification des éléments légers, voire même de leurs isotopes, alors que l'étude des éléments lourds est plus difficile. En vue d'optimiser la résolution énergétique, il convient d'augmenter la masse et/ou l'énergie de la particule incidente, ou encore de choisir un angle de détection proche de 180° .

La Figure 1-9 illustre le cas d'un échantillon épais où le projectile est diffusé à une profondeur x de la surface de l'échantillon par un atome de masse M_2 . L'énergie E_m mesurée par le détecteur placé en θ est exprimée par la relation :

$$E_m = K \cdot (E_0 - E_{in}) - \Delta E_{out} \quad (6)$$

ΔE_{in} est la perte d'énergie de la particule incidente lors du trajet d'entrée dans le matériau et

ΔE_{out} est la perte d'énergie de la particule incidente lors du trajet de sortie hors du matériau, définies suivant :

$$\Delta E_{in} = \int_0^x \rho(x) \cdot S(E) \cdot dx \quad \text{et} \quad \Delta E_{out} = \int_{x/\cos\theta}^0 \rho(x) \cdot S(E) \cdot dx \quad (7)$$

avec $\rho(x)$: densité du matériau et $S(E)$ le pouvoir d'arrêt.

Le calcul de la perte d'énergie via l'équation (6) nécessite donc une connaissance préalable des éléments présents dans l'échantillon afin d'estimer la densité du matériau ainsi que les pouvoirs d'arrêt. La mesure du spectre en énergie des particules diffusées permet ensuite d'établir des profils de concentration pour chaque élément présent dans l'échantillon. La

spectrométrie RBS est donc une méthode privilégiée pour l'analyse de films minces multicouches.

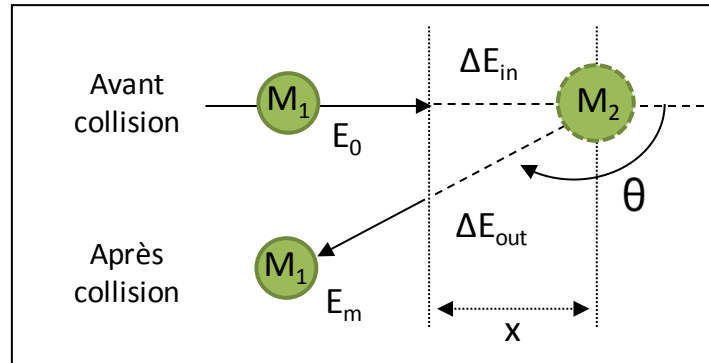


Figure 1-9 : Rétrodiffusion d'une particule d'énergie E_0 par un centre diffuseur localisé à une profondeur x de la surface de l'échantillon.

1.3.2 Section efficace

Comme c'était le cas pour les mesures par PIXE, il convient pour une analyse dans de bonnes conditions d'optimiser la section efficace, caractérisant ici le phénomène de diffusion élastique. En supposant que seule la force de répulsion coulombienne intervient dans le mécanisme de rétrodiffusion, la section efficace différentielle, exprimée en mb/sr , est calculée de façon classique selon la formule de Rutherford :

$$\sigma_R = \left(\frac{Z_1 \cdot Z_2 \cdot e^2}{4E_0} \right)^2 \cdot \frac{1}{\sin^4(\theta/2)} \quad (1)$$

Cependant cette description de la diffusion fait l'hypothèse que les réactions nucléaires d'une part et les effets d'écran du cortège électronique de l'atome cible d'autre part sont négligeables. Les réactions nucléaires ne concernent généralement pas les basses énergies. Les effets d'écran sont quant à eux négligeables si le projectile pénètre le cortège électronique de l'atome cible, mais ceci n'est pas toujours vérifié, surtout à basse énergie. Les effets d'écrantage sont dans ce cas introduits dans le calcul de la section efficace au moyen d'un facteur correctif :

$$\sigma = F \cdot \sigma_R \quad (2)$$

où F est le facteur correctif d'écrantage, dont les valeurs expérimentales sont tabulées¹⁷⁰

Au facteur correctif près, d'après l'équation (1), la section efficace, et par conséquent la sensibilité de la technique RBS, sera d'autant plus grande que :

- la charge Z_I du projectile sera élevée (dépendance de σ en Z_I^2).
- le noyau cible sera lourd (dépendance de σ en Z_2^2).
- l'énergie de projectile sera petite (dépendance de σ en E_0^{-2}).
- l'angle de détection θ sera petit (dépendance de σ en $[\sin(\theta/2)]^{-4}$).

Il est donc visible que les conditions favorables à une optimisation de la section efficace sont pour la plupart en conflit avec celles qui optimisent la résolution en énergie de l'équation (5). En pratique, un compromis est à trouver entre sélectivité et sensibilité. Considérant cet aspect, la méthode RBS est à utiliser pour doser de façon sensible mais peu sélective les éléments lourds présents dans une matrice légère, ou bien pour doser sélectivement des éléments légers mais avec une sensibilité amoindrie.

1.3.3 Analyse des données avec le code SIMNRA

Le traitement analytique des données RBS est réalisé au moyen de codes de simulation. Nous avons utilisé le programme SIMNRA, mis au point par Mayer.¹⁷¹ En vue de réaliser un spectre modèle qui sera ajusté de façon itérative aux données expérimentales grâce à la méthode des moindres carrés, SIMNRA nécessite la connaissance de l'énergie de faisceau, de l'angle de détection, des paramètres concernant la calibration en énergie et une estimation au moins approximative du nombre de particules incidentes. La cible doit être décrite comme une superposition de couches homogènes en composition et d'épaisseurs variables. Une estimation de la composition et de l'épaisseur de chacune des couches constituant la cible est requise ; ces paramètres seront ensuite modulés séquentiellement durant la procédure d'ajustement, afin que le spectre modèle soit le plus fidèle possible au spectre expérimental. Enfin, il est nécessaire de spécifier les fichiers de définition concernant les sections efficaces des processus physiques (uniquement collision élastique de type Rutherford dans notre cas).

Dans le cadre de notre étude, la technique RBS a été employée en complément des mesures PIXE pour calculer la charge déposée par le faisceau de protons sur l'échantillon et déterminer l'épaisseur de ce dernier. Ces deux paramètres sont effectivement nécessaires à la quantification des spectres PIXE.

L'épaisseur de l'échantillon (en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et la charge totale (en μC) qui est déposée par le faisceau de particules sont directement déduits du nombre de particules rétrodiffusées et de la composition de la cible calculés via SIMNRA. Ainsi l'épaisseur t de l'échantillon en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ est exprimée selon :

$$t = \frac{T}{N_A} \cdot 10^6 \cdot \sum_i w_i \cdot M_i \quad (1)$$

T est l'épaisseur de la cible en atome/ cm^2 , calculée par SIMNRA.

N_A est le nombre d'Avogadro.

w_i est la concentration de l'élément i et M_i sa masse molaire.

La charge totale collectée Q (en C) est quant à elle égale à :

$$Q = \frac{P}{\Omega} \cdot 1,6 \cdot 10^{-19} \quad (2)$$

P , calculé par SIMRA, est le nombre de particules×stéradian atteignant le détecteur de particules rétrodiffusées.

Ω est l'angle solide détection.

1.4 Dispositif expérimental

Une microsonde nucléaire (Figure 1-10) se compose habituellement d'un accélérateur de particules (A), d'une ou plusieurs lignes de faisceau (B), et d'une chambre d'analyse (C). Le but de cette sous-partie concernant l'instrumentation est double :

- Décrire brièvement ces éléments tels qu'ils fonctionnent au CENBG (Centre d'étude Nucléaire de Bordeaux-Gradignan, UMR 5797 CNRS/IN2P3), laboratoire dans lequel nous avons effectué nos expériences , et plus spécifiquement la plateforme AIFIRA.
- Préciser quelles ont été les conditions particulières nécessaires pour caractériser nos échantillons.

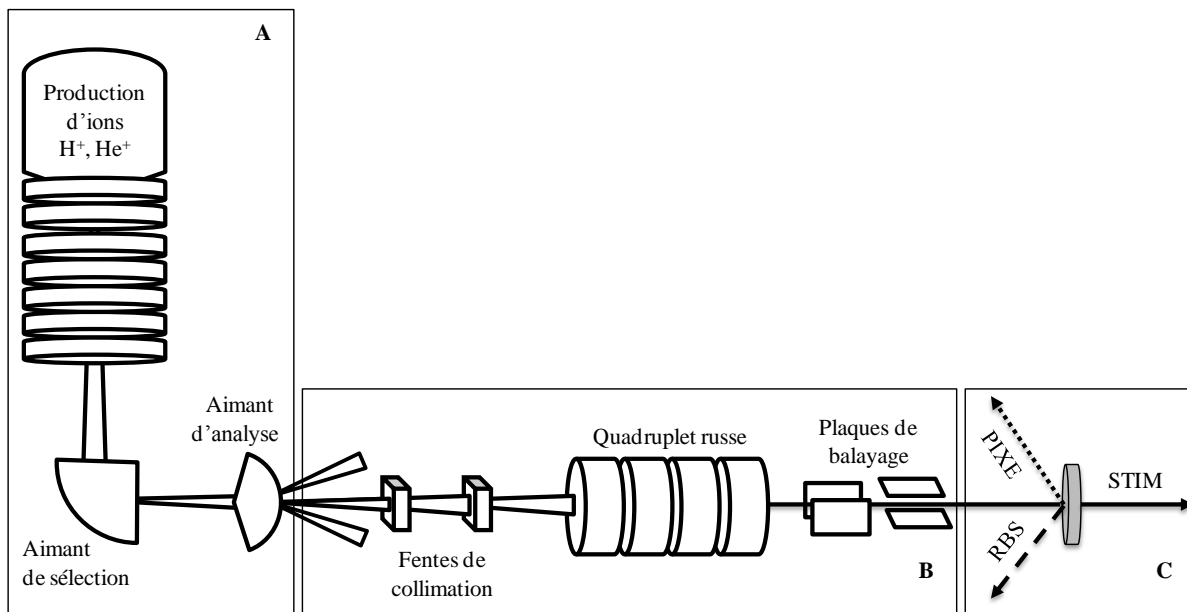


Figure 1-10 : Représentation schématique d'une microsonde nucléaire.

1.4.1 Production, accélération et sélections des particules (A)

1.4.1.1 Nature et énergie des particules

Les ions dans la gamme d'énergie du MeV sont généralement produits par des accélérateurs électrostatiques de type Van de Graaff. L'accélérateur du CENBG est un *3,5MV Singletron*.¹⁷² Ce dernier permet de produire, puis d'accélérer plusieurs types de particules (protons, deutérons, hélions) à des énergies pouvant atteindre 3,5 MeV. La nature et l'énergie des particules délivrées sont choisies en fonction des éléments à analyser. Les ions les plus souvent employés pour l'analyse PIXE sont les protons H^+ dont la section efficace d'ionisation dans la gamme de quelques MeV est, pour la plupart des éléments, supérieure à celle des particules plus lourdes. Le choix de l'énergie des ions doit être un compromis dicté par la composition de l'échantillon. En effet l'excitation des raies K des atomes légers ($11 < Z$

< 20) peut s'effectuer avec des protons dont l'énergie est comprise entre 1 et 2 MeV, alors que pour des éléments plus lourds, des particules d'énergie supérieure à 2 MeV seront préférentiellement utilisées.¹⁷³ La plupart de nos échantillons sont composés d'atomes qui les prédestinent à la première catégorie. C'est pourquoi, tous nos échantillons ont été analysés sous un faisceau de 1,5 MeV, exception faite, des verres dopés au Zinc, pour lesquels les conditions sont meilleures à 3 MeV.

1.4.1.2 Sélection des particules

A la sortie de l'accélérateur, les particules chargées sont sélectionnées suivant leur nature et leur énergie à l'aide d'un aimant de déviation à 90° (aimant de sélection). Les ions de même rapport charge / masse sont défléchis avec une trajectoire dont le rayon de courbure dépend de leur énergie. Cet ensemble permet ainsi de sélectionner un type d'ion particulier (H^+ , $^2D^+$, $^3He^+$, $^4He^+$) dont l'énergie est connue avec précision. Un aimant d'analyse permet de diriger le faisceau vers la ligne choisie. Plusieurs lignes sont disponibles, au CENBG : faisceau extrait, macrofaisceau, microfaisceau, nanofaisceau... Ces lignes diffèrent par leur résolution, leur modularité, le type d'applications auxquelles elles sont dédiées. Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé principalement la ligne microfaisceau, dont la résolution spatiale est de 1 micron, et plus occasionnellement la ligne nanofaisceau, actuellement dans une phase de développement technologique et scientifique, dont la résolution ultime se situera autour de 200 nm. Malgré des différences techniques importantes, leur principe de fonctionnement est similaire.

1.4.2 Ligne de faisceau, focalisation et balayage (B)

Les particules sont transportées dans la ligne à travers des tubes d'aluminium au sein desquels règne un vide de 10^{-4} à 10^{-5} Pa. Une ligne comporte un certain nombre de dispositifs permettant de conduire le faisceau de particules de l'accélérateur à l'échantillon. Ils ont pour fonction de délimiter la taille du faisceau au moyen de fentes et de collimateurs (diaphragmes en platine), de contrôler sa position dans la ligne grâce à des profileurs et des quartz escamotables, de mesurer son intensité en différents points de la ligne grâce des cages de Faraday escamotables, et enfin de guider la trajectoire des particules grâce à des lentilles magnétiques quadripolaires. Sur la ligne microfaisceau, ces lentilles sont couplées deux à deux en un quadruplet, alors qu'un quintuplet est présent sur la ligne nanofaisceau. Enfin lorsque le faisceau est réglé et stable, des paires de plaques sous tension assurent la déflexion

du faisceau dans le plan horizontal et dans le plan vertical. Elles permettent le balayage de la surface de l'échantillon par le faisceau, ceci dans une fenêtre de quelques microns à deux millimètres selon la ligne choisie, l'énergie et la charge des ions incidents. La fréquence de balayage a été choisie à 50 Hz pour nos échantillons, notamment pour limiter les dommages des échantillons biologiques sous irradiation.¹⁷⁴

1.4.3 Chambre d'analyse (C)

1.4.3.1 Composants

La chambre de la ligne nanofaisceau du CENBG (Figure 1-11) a été prise en exemple pour décrire les principaux composants. A quelques différences près, l'organisation est la même pour la ligne microfaisceau. La chambre d'analyse comporte donc un porte-échantillon, motorisé en XYZ, qui permet d'ajuster la position de l'échantillon. Derrière ce dernier se situe un porte objet sur lequel sont présent : un objectif de microscope relié à une caméra pour repérer les zones de l'échantillon à analyser, une cage de faraday pour mesurer le courant sur cible mince et un détecteur d'ions transmis. Enfin deux détecteurs permettent de recueillir les signaux PIXE et RBS. La chambre est maintenue sous un vide de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} Pa.

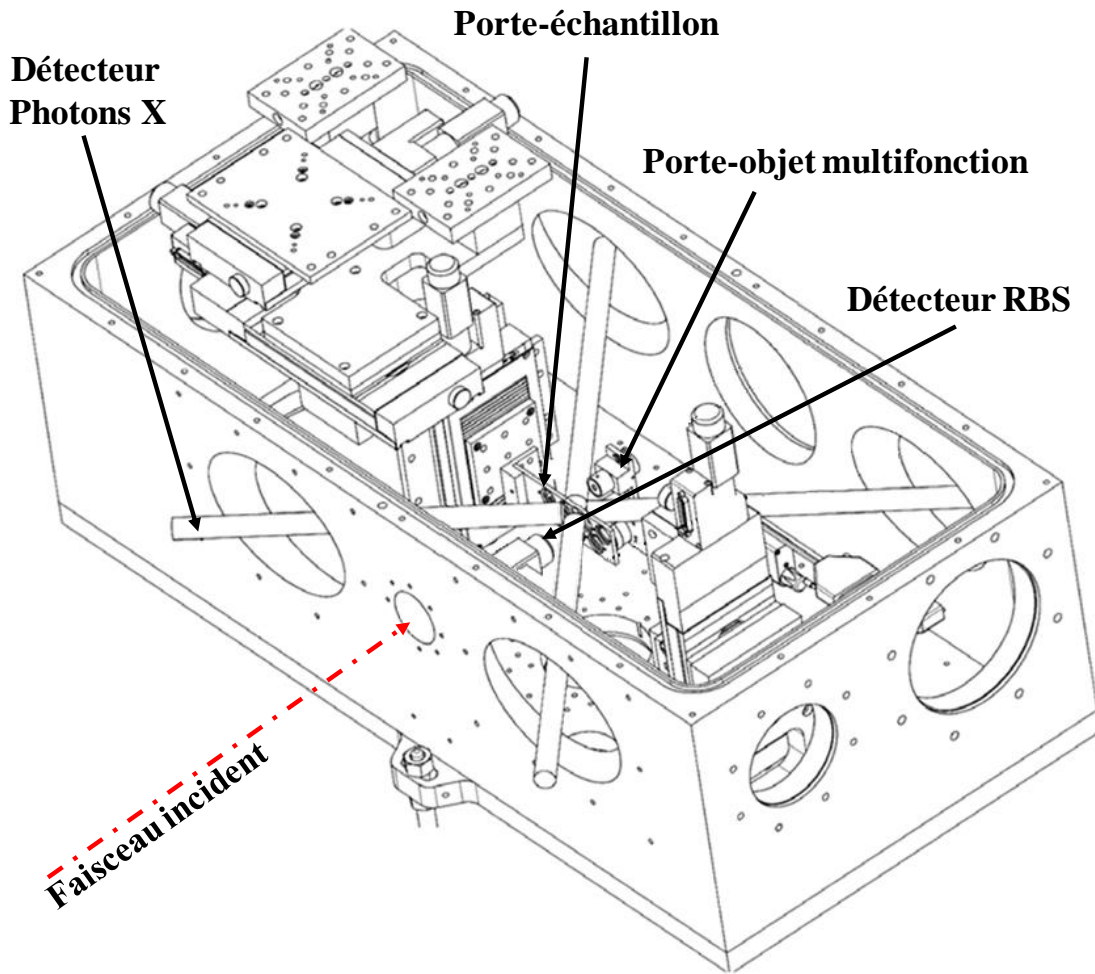


Figure 1-11 : Chambre d'analyse de la ligne nanofaisceau du CENBG.¹⁷⁵

1.4.3.2 Détecteurs

- Le détecteur de particules rétrodiffusées utilisé en RBS consiste en un détecteur solide à barrière de surface, composé de silicium intrinsèque de quelques mm d'épaisseur et recouvert d'un film d'or. Le détecteur, de forme circulaire, est placé à 135° de l'axe du faisceau.
- Le détecteur de photons X est un spectromètre dispersif en énergie (EDS) placé à 135° de l'axe du faisceau. Le spectromètre utilisé est un détecteur à semi-conducteurs à cristaux de silicium dopés au lithium Si(Li), dont la résolution est proche de 150 eV dans la gamme d'énergie concernée. Après la mise en forme de l'impulsion par un amplificateur, un analyseur multicanal permet de classer le nombre d'événements en fonction de leur énergie, et donc de reconstituer le spectre en énergie du rayonnement X émis par l'échantillon. Le

détecteur Si(Li) est maintenu à basse température dans un cryostat rempli d'azote liquide afin d'éviter toute détérioration (diffusion possible de la jonction Li), mais aussi pour assurer une conductivité électrique minimale du semi-conducteur en dehors de la présence des paires électron-trou et pour réduire au maximum le bruit de la chaîne d'acquisition. D'autre part, devant les risques de pollution, l'entrée du détecteur est fermée par une fenêtre en béryllium de 12 μm d'épaisseur. Celle-ci atténue peu les rayons X d'énergie supérieure à 1 keV, permettant la détection des éléments à partir du sodium ($Z = 11$). Le Tableau 1-2 résume les caractéristiques du détecteur Si(Li), dont la description est nécessaire à l'estimation de l'efficacité intrinsèque de détection, en vue d'une analyse quantitative absolue avec GUPIX.

Surface active du cristal	Épaisseur du cristal	Fenêtre	Epaisseur de la fenêtre	Contact	Résolution à 5,89 keV
80 mm ²	5 mm	Be	12 μm	Au	150 eV

Tableau 1-2 : Caractéristiques du détecteur rayons X utilisé.

1.4.3.3 'Funny Filter'

Comme cela a été précisé dans le paragraphe 1.4.1.1, les verres dopés au Zinc ont été analysés grâce à un faisceau de 3 MeV, dans le but d'optimiser la section efficace de production des raies K de ce dernier. Cependant, de telles énergies induisent un fort taux de comptage de photons X. Un phénomène d'empilement est alors observé : trop de photons sont envoyés sur la chaîne de détection et il arrive que deux d'entre eux (voire plus) soient détectés simultanément. Le résultat est l'apparition d'un 'pic somme' dont l'énergie correspond à la somme des énergies associées aux impulsions détectées simultanément. Il apparaît également une augmentation de l'intensité du fond continu sous forme d'un plateau s'étalant de l'énergie des raies X les plus intenses jusqu'à une valeur correspondant à l'énergie du pic somme. Dans notre cas, en raison de ce phénomène d'empilement, les raies caractéristiques des éléments majeurs légers de la matrice (Si, P, Ca) peuvent masquer les raies K du Zinc, qui est présent seulement sous forme de traces. Il est alors recommandé d'interposer un filtre absorbant entre la cible et le détecteur, afin de réduire la composante basse énergie du spectre X et de favoriser la détection des éléments plus lourds, dont le rendement X est plus faible.

Cependant nous désirons également dans notre étude doser le magnésium, élément léger ($Z = 12$) présent lui aussi sous forme de traces. Il est donc dans ce cas délicat d'utiliser un filtre qui supprimerait le signal de cet élément trace. Une solution ingénieuse pour l'analyse simultanée des éléments lourds et légers est l'emploi d'un filtre percé en son centre, dit 'Funny filter'. Proposée pour la première fois par Harrison et Eldred¹⁷⁶, l'utilisation d'un Funny filter permet de réduire considérablement l'intensité des raies X des éléments légers qui voient de la sorte leur angle solide de détection diminuer. Néanmoins un nombre suffisant de photons (5 à 25 %) passe par le trou au centre du filtre, octroyant un taux de comptage satisfaisant pour les éléments légers. Quant aux photons X des éléments plus lourds, tels le strontium, ils possèdent des énergies caractéristiques plus élevées et sont peu affectés par l'interposition du filtre.¹⁷⁷

Nous avons donc utilisé un filtre en aluminium de 100 μm d'épaisseur, percé en son centre d'un trou de 2 mm de diamètre. L'emploi d'un Funny filter implique que l'angle solide n'est plus constant pour chaque raie élémentaire : il varie selon l'énergie de l'émission X. Le paramètre instrumental H (paragraphe 1.2.2.2), utilisé pour le calcul des concentrations sous GUPIX, doit par conséquent être déterminé expérimentalement. Cette calibration est réalisée par l'analyse de standards de concentration connue.

Bibliographie

-
- ¹ Barker, F. G. *Neurosurgery* **1997**, 41, 999-999.
- ² Pietrzak, W. S. In *Musculoskeletal Tissue Regeneration*; Humana Press: 2008, p 3-17.
- ³ Bobbio, A. *Bulletin of the history of dentistry* **1972**, 20, 1-6.
- ⁴ Ratner, B. D.; Schoen, F.; Hoffman, A.; Lemons, J.; *Biomaterials Science*; Elsevier Science, 1997.
- ⁵ Leeuwenburgh, S. C. G.; Jansen, J. A.; Malda, J.; Dhert, W. A.; Rouwkema, J.; van Blitterswijk, C.A.; Kirkpatrick, C. J.; Williams, D. F. *Biomaterials* **2008**, 29, 3047-3052.
- ⁶ Williams, D. F.; Black, J.; Doherty, P. J. In *Second consensus conference on definitions in biomaterials*; Elsevier: Chester (U.K.), 1992; Vol. 10.
- ⁷ Couret, I. *Médecine Nucléaire* **2004**, 28, 57-65.
- ⁸ Rho, J.-Y.; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P. *Medical Engineering & Physics* **1998**, 20, 92-102.
- ⁹ www.afblum.be/bioafb/struos/struos.htm, Image réalisée par Eric Walravens.
- ¹⁰ <http://ltp2.epfl.ch/Cours/Biomat/BioMat-02.pdf>, Présentation de Jacques LEMAITRE.
- ¹¹ Besseau, L.; Giraud-Guille, M.-M. *Journal of Molecular Biology* **1995**, 251, 197-202.
- ¹² Weiner, S.; Traub, W. *FASEB J.* **1992**, 6, 879-885.
- ¹³ Weiner, S.; Wagner, H. D. *Annual Review of Materials Science* **1998**, 28, 271-298.
- ¹⁴ Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Sfihi, H.; Barroug, A. *Materials Science & Engineering C- Biomimetic and Supramolecular Systems* **2007**, 27, 198-205.
- ¹⁵ Marie, P. J. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* **1992**, 7, 17-24.
- ¹⁶ Parfitt, A. *Calcified Tissue International* **1984**, 36, S37-S45.
- ¹⁷ Vaes, G. *J. Cell Biol.* **1968**, 39, 676-697.

-
- ¹⁸ Nih Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, D.; Therapy *JAMA* **2001**, 285, 785.
- ¹⁹ Chappard, D.; Baslé, M. F.; Legrand, E.; Audran, M. *Morphologie* **2008**, 92, 162-170.
- ²⁰ Chavassieux, P.; Seeman, E.; Delmas, P. D. *Endocr Rev* **2007**, 28, 151-164.
- ²¹ Debet-Méjean, A.; Méjean, A. *Progrès en Urologie* **2008**, suppl.7, 246
- ²² Burg, K. J. L.; Porter, S.; Kellam, J. F. *Biomaterials* **2000**, 21, 2347-2359.
- ²³ Donaruma, L. G. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters* **1988**, 26, 414.
- ²⁴ Williams, D. F. *Biomaterials* **2008**, 29, 2941-2953.
- ²⁵ Cypher, T. J.; Grossman, J. P. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 35, 413-417.
- ²⁶ Arrington, E. D.; Smith, W. J.; Chambers, H. G.; Bucknell, A. L.; Davino, N. A. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1996**, 329, 300-309.
- ²⁷ Carter, G. *AORN* **1999**, 70, 659-670.
- ²⁸ LeGeros, R. Z.; Daculsi, G.; LeGeros, J. P. In *Musculoskeletal Tissue Regeneration* 2008, p 153-181.
- ²⁹ Hench, L. L. *Journal of the American Ceramic Society* **1991**, 74, 1487-1510.
- ³⁰ Hench, L. L.; Splinter, R. J.; Allen, W. C.; Greenlee, T. K. *Journal of Biomedical Materials Research* **1971**, 5, 117-141.
- ³¹ Hench, L. L.; C. G. Pantano, J.; Buscemi, P. J.; Greenspan, D. C. *Journal of Biomedical Materials Research* **1977**, 11, 267-282.
- ³² Hench, L. L.; Splinter, R. J.; Allen, W. C.; Greenlee, T. K. *Journal of Biomedical Materials Research* **1971**, 5, 117-141.
- ³³ Hench, L. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2006**, 17, 967-978.
- ³⁴ Larry L, H. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1988**, 523, 54-71.

-
- ³⁵ Hench, L. L.; Wheeler, D. L.; Greenspan, D. C. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **1998**, *13*, 245-250.
- ³⁶ Cao, W.; Hench, L. L. *Ceramics International* **1996**, *22*, 493-507.
- ³⁷ Hench, L. L.; Wheeler, D. L.; Greenspan, D. C. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **1998**, *13*, 245-250.
- ³⁸ Li, R.; Clark, A. E.; Hench, L. L. *Journal of Applied Biomaterials* **1991**, *2*, 231-239.
- ³⁹ Priya, S.; Larry, L. H. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, *54*, 608-618.
- ⁴⁰ Kim, I. Y.; Kawachi, G.; Kikuta, K.; Cho, S. B.; Kamitakahara, M.; Ohtsuki, C. *Journal of the European Ceramic Society* **2008**, *28*, 1595-1602.
- ⁴¹ Atwood, R. C.; Jones, J. R.; Lee, P. D.; Hench, L. L. *Scripta Materialia* **2004**, *51*, 1029-1033.
- ⁴² Fathi, M. H.; Doostmohammadi, A. *Journal of Materials Processing Technology* **2009**, *209*, 1385-1391.
- ⁴³ Ohtsuki, C.; Miyazaki, T.; Tanihara, M. *Materials Science and Engineering: C* **2002**, *22*, 27-34.
- ⁴⁴ Kokubo, T.; Takadama, H. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907-2915.
- ⁴⁵ Bohner, M.; Lemaître, J. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2175-2179.
- ⁴⁶ Kokubo, T. *Biomaterials* **1991**, *12*, 155-163.
- ⁴⁷ Fujibayashi, S.; Neo, M.; Kim, H.-M.; Kokubo, T.; Nakamura, T. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1349-1356.
- ⁴⁸ Lao, J.; Jallot, E.; Nedelec, J.-M. *Chemistry of Materials* **2008**, *20*, 4969-4973.
- ⁴⁹ Blaker, J. J.; Nazhat, S. N.; Boccaccini, A. R. *Biomaterials* **2004**, *25*, 1319-1329.
- ⁵⁰ Takata, M. K.; Saiki, M.; Sumita, N. M.; Saldiva, P. H. N.; Pasqualucci, C. A. *J. of Radioanalytical & Nuclear Chemistry* **2005**, *264*, 5.

-
- ⁵¹ Robert, K. R. *Journal of Bone and Mineral Research* **1998**, *13*, 749-758.
- ⁵² Stendig-Lindenberg, G.; Tepper, R.; Leichter, I. *Magnesium Research* **1993**, *6*, 155-163.
- ⁵³ Zreiqat, H.; Howlett, C. R.; Zannettino, A.; Evans, P.; Schulze-Tanzil, G.; Knabe, C.; Shakibaei, M. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *62*, 175-184.
- ⁵⁴ Yamaguchi, M.; Inamoto, K.; Suketa, Y. *Research in Experimental Medicine* **1986**, *186*, 337-342.
- ⁵⁵ Hashizume, M.; Yamaguchi, M. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1993**, *122*, 59-64.
- ⁵⁶ Kishi, S.; Yamaguchi, M. *Biochemical Pharmacology* **1994**, *48*, 1225-1230.
- ⁵⁷ Bao, B.; Prasad, A. S.; Beck, F. W. J.; Godmere, M. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2003**, *285*, E1095.
- ⁵⁸ Zhu, Y.; Kaskel, S. *Microporous and Mesoporous Materials* **2009**, *118*, 176-182.
- ⁵⁹ Vallet-Regí, M.; Ramila, A.; del Real, R. P.; Perez-Pariente, J. *Chemistry of Materials* **2001**, *13*, 308-311.
- ⁶⁰ Myungkoo, S.; Ho-Jin, L.; Jin-Young, P.; Lee, U. H.; Young-Uk, K.; Deug Joong, K. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 1402-1408.
- ⁶¹ Rámila, A.; Muñoz, B.; Pérez-Pariente, J.; Vallet-Regí, M. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2003**, *26*, 1199-1202.
- ⁶² Vallet-Regí, M.; Doadrio, J. C.; Doadrio, A. L.; Izquierdo-Barba, I.; Pérez-Pariente, J. *Solid State Ionics* **2004**, *172*, 435-439.
- ⁶³ Charnay, C.; Bégu, S.; Tourné-Péteilh, C.; Nicole, L.; Lerner, D. A.; Devoisselle, J. M. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *57*, 533-540.
- ⁶⁴ Vallet-Regí, M. *Chemistry - A European Journal* **2006**, *12*, 5934-5943.
- ⁶⁵ Babonneau, F.; Yeung, L.; Steunou, N.; Gervais, C.; Ramila, A.; Vallet-Regi, M. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2004**, *31*, 219-223.

-
- ⁶⁶ Jones, J. R.; Poologasundarampillai, G.; Atwood, R. C.; Bernard, D.; Lee, P. D. *Biomaterials* **2007**, 28, 1404-1413.
- ⁶⁷ Wang, Z.; Chang, J.; Bai, F.; Sun, X.; Lin, K.; Chen, L.; Lu, J.; Dai, K. *Nature Precedings* **2010**.
- ⁶⁸ O'Brien, F. J.; Harley, B. A.; Yannas, I. V.; Gibson, L. J. *Biomaterials* **2005**, 26, 433-441.
- ⁶⁹ Hing, K. A.; Annaz, B.; Saeed, S.; Revell, P. A.; Buckland, T. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2005**, 16, 467-475.
- ⁷⁰ Livage, J. *Le Monde* **26 oct.1977**.
- ⁷¹ Brinker, C. J.; Scherer, G. W., *Sol-gel Science,Eds.*; Academic Press: San Diego, **1990**.
- ⁷² Iler, R.K. *The Chemistry of Silica*, Wiley: New York, **1979**
- ⁷³ Saravanapavan, P.; Hench, L. L. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2003**, 318, 1-13.
- ⁷⁴ Brinker, C. J.; Clark, D. E.; Ulrich, D. R. *Better ceramics through chemistry*, 1988.
- ⁷⁵ Lin, S.; Ionescu, C.; Pike, K. J.; Smith, M. E.; Jones, J. R. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, 19, 1276.
- ⁷⁶ Lin, S.; Ionescu, C.; Baker, S.; Smith, M.; Jones, J. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2010**, 53, 255.
- ⁷⁷ Brunauer, S.; Deming, L. S.; Deming, W. E.; Teller, E. *Journal of the American Chemical Society* **1940**, 62, 1723-1732.
- ⁷⁸ Sing, K. S. W.; Everett, D. H.; Haul, R. A. W.; Moscou, L.; Pierotti, R. A.; Rouquerol, J.; Siemieniewska, T. *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57.
- ⁷⁹ Rouquerol, F.; Luciani, L.; Llewellyn, P.; Denoyel, R.; Rouquerol, J. *Tech. Ing.*, P1050.
- ⁸⁰ Rouquerol, J.; Rouquerol, F.; Sing, K. S. W.; *Adsorption by Powders and Porous Solids*, ac. Press of SURREY: 1998.

-
- ⁸¹ Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. *Journal of the American Chemical Society* **1951**, *73*, 373-380.
- ⁸² Chu, B.; Zhou, Z. *Physical Chemistry of Polyoxyalkylene Block Copolymer Surfactant*; Nace VM: New York, 1996.
- ⁸³ Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. *Nature* **1992**, *359*, 710-712.
- ⁸⁴ Zhao, D.; Feng, J.; Huo, Q.; Melosh, N.; Fredrickson, G. H.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. *Science* **1998**, *279*, 548-552.
- ⁸⁵ Yang, P.; Zhao, D.; Margolese, D. I.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. *Chem. Mat.* **1998**, *11*, 2813.
- ⁸⁶ Yang, P.; Zhao, D.; Margolese, D. I.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. *Chemistry of Materials* **1999**, *11*, 2813.
- ⁸⁷ Kriesel, J. W.; Sander, M. S.; Tilley, T. D. *Advanced Materials* **2001**, *13*, 331-335.
- ⁸⁸ Soler-Illia, G. J. d. A. A.; Crepaldi, E. L.; Grosso, D.; Sanchez, C. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2003**, *8*, 109-126.
- ⁸⁹ Yan, X.; Yu, C.; Zhou, X.; Tang, J.; D, Z. *Angewandte Chemie* **2004**, *43*, 5980-5984.
- ⁹⁰ Lopez-Noriega, A.; Arcos, D.; Izquierdo-Barba, I.; Sakamoto, Y.; Terasaki, O.; Vallet-Regi, M. *Chemistry of Materials* **2006**, *18*, 3137-3144.
- ⁹¹ Yun, H.-s.; Kim, S.-e.; Hyun, Y.-t. *Solid State Sciences* **2008**, *10*, 1083-1092.
- ⁹² Soler-Illia, G. J. d. A. A.; Crepaldi, E. L.; Grosso, D.; Sanchez, C. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2003**, *8*, 109-126.
- ⁹³ Ivanova, R.; Alexandridis, P.; Lindman, B. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2001**, *183-185*, 41-53.
- ⁹⁴ Xia, W.; Chang, J. *Journal of Controlled Release* **2006**, *110*, 522-530.

-
- ⁹⁵ Jones, J.; Hench, L. L. *J. of Biomed. Mat.Res. B: Applied Biomaterials* **2004**, 68B, 36-44.
- ⁹⁶ Atwood, R. C.; Jones, J. R.; Lee, P. D.; Hench, L. L. *Scripta Materialia* **2004**, 51, 1029-1033.
- ⁹⁷ Holland, B. T.; Blanford, C. F.; Stein, A. *Science* **1998**, 281, 538-540.
- ⁹⁸ Zou, D.; Ma, S.; Guan, R.; Park, M.; Sun, L.; Aklonis, J. J.; Salovey, R. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1992**, 30, 137-144.
- ⁹⁹ Wijnhoven, J. E. G. J.; Bechger, L.; Vos, W. L. *Chemistry of Materials* **2001**, 13, 4486-4499.
- ¹⁰⁰ Wijnhoven, J. E.; G; J; Vos, W. L. *Science* **1998**, 281, 802-804.
- ¹⁰¹ Pieranski, P. *Contemporary Physics* **1983**, 24, 25 - 73.
- ¹⁰² Velev, O. D.; Jede, T. A.; Lobo, R. F.; Lenhoff, A. M. *Nature* **1997**, 389, 447-448.
- ¹⁰³ Velev, O. D.; Jede, T. A.; Lobo, R. F.; Lenhoff, A. M. *Chemistry of Materials* **1998**, 10, 3597-3602.
- ¹⁰⁴ Denkov, N. D.; Velev, O. D.; Kralchevsky, P. A.; Ivanov, I. B.; Yoshimura, H.; Nagayama, K. *Nature* **1993**, 361, 26-26.
- ¹⁰⁵ Jiang, P.; Bertone, J. F.; Hwang, K. S.; Colvin, V. L. *Chemistry of Materials* **1999**, 11, 2132-2140.
- ¹⁰⁶ Géraud, E., *Thèse, Université Blaise Pascal*, **2006**.
- ¹⁰⁷ Dong, W.; Sakamoto, J.; Dunn, B. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2003**, 26, 641-644.
- ¹⁰⁸ Yan, H.; Blanford, C. F.; Holland, B. T.; Smyrl, W. H.; Stein, A. *Chemistry of Materials* **2000**, 12, 1134.
- ¹⁰⁹ Géraud, E.; Prévot, V.; Leroux, F. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **2006**, 67, 903-908.

-
- ¹¹⁰ Géraud, E.; Bouhent, M.; Derriche, Z.; Leroux, F.; Prévot, V.; Forano **2007**, *C. J. of Physics & Chemistry of Solids*, **68**, 818-823.
- ¹¹¹ Yan, H.; Blanford, C. F.; Holland, B. T.; Smyrl, W. H.; Stein, A. *Chemistry of Materials* **2000**, *12*, 1134.
- ¹¹² Yan, H.; Zhang, K.; Blanford, C. F.; Francis, L. F.; Stein, A. *Chemistry of Materials* **2001**, *13*, 1374.
- ¹¹³ Melde, B. J.; Stein, A. *Chemistry of Materials* **2002**, *14*, 3326-3331.
- ¹¹⁴ Zhang, K.; Francis, L. F.; Yan, H.; Stein, A. *Journal of the American Ceramic Society* **2005**, *88*, 587-592.
- ¹¹⁵ Sanders, J. V. *Nature* **1964**, *204*, 1151-1153.
- ¹¹⁶ Míguez, H.; Meseguer, F.; López, C.; Mifsud, A.; Moya, J. S.; Vasquez, L. *Langmuir* **1997**, *13*, 6009.
- ¹¹⁷ Woodcock, L. V. *Nature* **1997**, *385*, 141-143.
- ¹¹⁸ Xia, Y.; Gates, B.; Yin, Y.; Lu, Y. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 693-713.
- ¹¹⁹ Yan, H.; Blanford, C. F.; Holland, B. T.; Smyrl, W. H.; Stein, A. *Chemistry of Materials* **2000**, *12*, 1134-1141.
- ¹²⁰ Hachisu, S.; Kobayashi, Y. *Journal of Colloid and Interface Science* **1974**, *46*, 470-476.
- ¹²¹ Holland, B. T.; Blanford, C. F.; Do, T.; Stein, A. *Chemistry of Materials* **1999**, *11*, 795-805.
- ¹²² Baba, M.; Nedelec, J.-M.; Lacoste, J. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 12884-12890.
- ¹²³ Billamboz, N.; Baba, M.; Grivet, M.; Nedelec, J.-M. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 12032.
- ¹²⁴ Lindsay, W. *Chemical equilibria in sols*; Wiley, 1979

-
- ¹²⁵ Walsh, W. R.; Morberg, P.; Yu, Y.; Yang, J. L.; Haggard, W.; Sheath, P. C.; Svehla, M.; Bruce, W. J. M. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **2003**, 406, 228-236
- ¹²⁶ www.BioChrom.fr
- ¹²⁷ Clupper, D. C.; Gough, J. E.; Hall, M. M.; Clare, A. G.; LaCourse, W. C.; Hench, L. L. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003**, 67A, 285-294.
- ¹²⁸ Lao, J.; Nedelec, J. M.; Jallot, E. *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, 112, 9418-9427.
- ¹²⁹ Vallet-Regi, M.; Salinas, A. J.; Roman, J.; Gil, M. *Journal of Materials Chemistry* **1999**, 9, 515-518.
- ¹³⁰ Zachariasen, W. H. *Physical Review* **1932**, 40, 914.
- ¹³¹ Pedone, A.; Malavasi, G.; Menziani, M. C. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, 113, 15723-15730.
- ¹³² Yan, X. X.; Huang, X. H.; Yu, C. Z.; Deng, H. X.; Wang, Y.; Zhang, Z. D.; Qiaoc, S. Z.; Lu, G. Q.; Zhao, D. Y. *Biomaterials* **2006**, 27, 3396-3403.
- ¹³³ Dorozhkin, S. V. *Journal of Materials Science* **2007**, 42, 1061-1095.
- ¹³⁴ Lu, X.; Leng, Y. *Biomaterials* **2005**, 26, 1097-1108.
- ¹³⁵ Gomes, S.; Renaudin, G.; Jallot, E.; Nedelec, J. M. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2009**, 1, 505-513.
- ¹³⁶ Ohtsuki, C.; Kokubo, T.; Yamamuro, T. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1992**, 143, 84.
- ¹³⁷ Hench, L. L.; Splinter, R.; Allen, W.; Greenlee, T. K. *Journal of Biomedical Materials research* **1971**, 2, 117.
- ¹³⁸ Hench, L. L. *Journal of the American Ceramic Society* **1998**, 81, 1705-1728.
- ¹³⁹ Jaroch, D. B.; Clupper, D. C. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, 82A, 575-588.

-
- ¹⁴⁰ Aina, V.; Malavasi, G.; Fiorio Pla, A.; Munaron, L.; Morterra, C. *Acta Biomaterialia* **2009**, *5*, 1211-1222.
- ¹⁴¹ Pesina, T. L.; Zakreuska, V. A.; Puken, O. P. *J. Am. Ceram. Soc* **1984**, *54*.
- ¹⁴² Linati, L.; Lusvardi, G.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Menziani, M. C.; Mustarelli, P.; Segre, U. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 4989-4998.
- ¹⁴³ Lusvardi, G.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Menziani, M. C. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 9753-9760
- ¹⁴⁴ Pereira, M.; Clark, A. E.; Hench, L. L. *Journal of the American Ceramic Society* **1995**, *78*, 2463-2468.
- ¹⁴⁵ Gomes, S.; Renaudin, G.; Jallot, E.; Nedelec, J. M. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *Submitted*.
- ¹⁴⁶ Kanzaki, N.; Onuma, K.; Treboux, G.; Tsutsumi, S.; Ito, A. *J. of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 4189-4194.
- ¹⁴⁷ Bigi, A.; Foresti, E.; Gandolfi, M.; Gazzano, M.; Roveri, N. *J. of Inorganic Biochemistry* **1995**, *58*, 49-58.
- ¹⁴⁸ Deng, Y.; Li, X.; Li, Q. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2009**, *48*, 8829-8836.
- ¹⁴⁹ Trocellier, P.; Trouslard, P. *Tech. Ing.* **2002**, *TA3*, 2560.
- ¹⁵⁰ Ziegler, J. F.; Chu, W. K. *Atomic Data and Nuclear Data Tables* **1974**, *13*, 463-489.
- ¹⁵¹ Johansson, T. B.; Akselsson, R.; Johansson, S. A. E. *Nuclear Instruments and Methods* **1970**, *84*, 141-143.
- ¹⁵² Moseley, H. G. *Phil. Mag.* **1914**, 703-714.
- ¹⁵³ Moretto, P.; Beck, L. *Tech. Ing.* **2003**, *TA3*, P2557.
- ¹⁵⁴ Mitchell, I.; Barfoot, K. *Nuclear Science Applications* **1981**, *1*, 99-162.

-
- ¹⁵⁵ Strivay, D., *Thèse, Université de Liège*, **2001**.
- ¹⁵⁶ Lao, J., *Thèse, Université Blaise Pascal*, **2007**.
- ¹⁵⁷ Salem, S. I.; Panossian, S. L.; Krause, R. A. *Atomic Data and Nuclear Data Tables* **1974**, *14*, 91-109.
- ¹⁵⁸ *Handbuch der Physik*; Flüge (Springer-Verlag) ed.; Merzbacher, E.; Lewis, H. G., Eds., 1958; Vol. 34.
- ¹⁵⁹ Hansteen, J. M.; Mosebekk, O. P. *Nuclear Physics A* **1973**, *201*, 541-560.
- ¹⁶⁰ Brandt, W.; Lapicki, G. *Physical Review A* **1981**, *23*, 1717.
- ¹⁶¹ Merzbacher, E.; Lewis, H. *Encyclopedia of Physics* **1958**, 166.
- ¹⁶² Johansson, S. A. E. *Endeavour* **1989**, *13*, 48-53.
- ¹⁶³ *Beam optics of quadrupole probe-forming systems*; Hilger ed.; Grime, J. W.; Watt, F., Eds. Bristol, 1984.
- ¹⁶⁴ Reuter, W.; Lurio, A.; Cardone, F.; Ziegler, J. F. *Journal of Applied Physics* **1975**, *46*, 3194-3202.
- ¹⁶⁵ Campbell, J. L.; Maxwell, J. A.; Teesdale, W. J. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **1995**, *95*, 407-421.
- ¹⁶⁶ Maxwell, J. A.; Leigh, R. G.; Campbell, J. L.; Paul, H. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **1984**, *3*, 301-304.
- ¹⁶⁷ Mitchell, I.; Barfoot, K. *Nuclear Science Applications* **1981**, *1*, 99-162.
- ¹⁶⁷ Guibert, G., *Thèse, Université Blaise Pascal*, **2004**.
- ¹⁶⁸ Cahill, T. A. *Annual Review of Nuclear and Particle Science* **1980**, *30*, 211-252.
- ¹⁶⁹ Revel, G.; Berger, P. *Tech. Ing.* **2005**, 2563.

-
- ¹⁷⁰ *Handbook of modern ion beam materia analysis*; Tesmer, J. R.; Nastasi, M., Eds.; Ed. Materials Research Society: Pittsburgh, **1995**.
- ¹⁷¹ Mayer, M. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2002**, 194, 177-186.
- ¹⁷² Incerti, S.; Habchi, C.; Moretto, P.; Olivier, J.; Seznec, H. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2006**, 249, 738-742.
- ¹⁷³ Moretto, P.; Beck, L. *Tech. Ing.* **2003**, TA3, P2558.
- ¹⁷⁴ Llabador, Y.; Bertault, D.; Gouillaud, J. C.; Moretto, P. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **1990**, 49, 435-440.
- ¹⁷⁵ Barberet, P.; Incerti, S.; Andersson, F.; Delalee, F.; Serani, L.; Moretto, P. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2009**, 267, 2003-2007.
- ¹⁷⁶ Harrison, J. F.; Eldred, R. A. *Adv. X-ray An.* **1974**, 560-583.
- ¹⁷⁷ Gama, S.; Volfinger, M.; Ramboz, C.; Rouer, O. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2001**, 181, 150-156.